

SÉRIE A,
N° 3926
N° D'ORDRE
4777

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Christiane CARRA de VAUX SAINT CYR

1^{re} THÈSE : **Caractérisation des protéines perchlorosolubles des sérums humains normaux et pathologiques ; mise en évidence de leurs origines.**

2^e THÈSE : **Propositions données par la Faculté.**

Soutenues le 18 Juin 1962, devant la Commission d'examen.

M. R. WURMSER	<i>Président</i>
M ^{lle} LE BRETON	} <i>Examineurs</i>
M. ACHER	

LONS - LE - SAUNIER
IMPRIMERIE MAURICE DECLUME

1962

SÉRIE A,
N° 3926
N° D'ORDRE
4777

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Christiane CARRA de VAUX SAINT CYR

1^{re} THÈSE : **Caractérisation des protéines perchlorosolubles des sérums humains normaux et pathologiques ; mise en évidence de leurs origines.**

2^e THÈSE : **Propositions données par la Faculté.**

Soutenues le 18 Juin 1962, devant la Commission d'examen.

M. R. WURMSER	<i>Président</i>
M ^{lle} LE BRETON	} <i>Examineurs</i>
M. ACHER	

LONS - LE - SAUNIER
IMPRIMERIE MAURICE DECLUME

1962



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

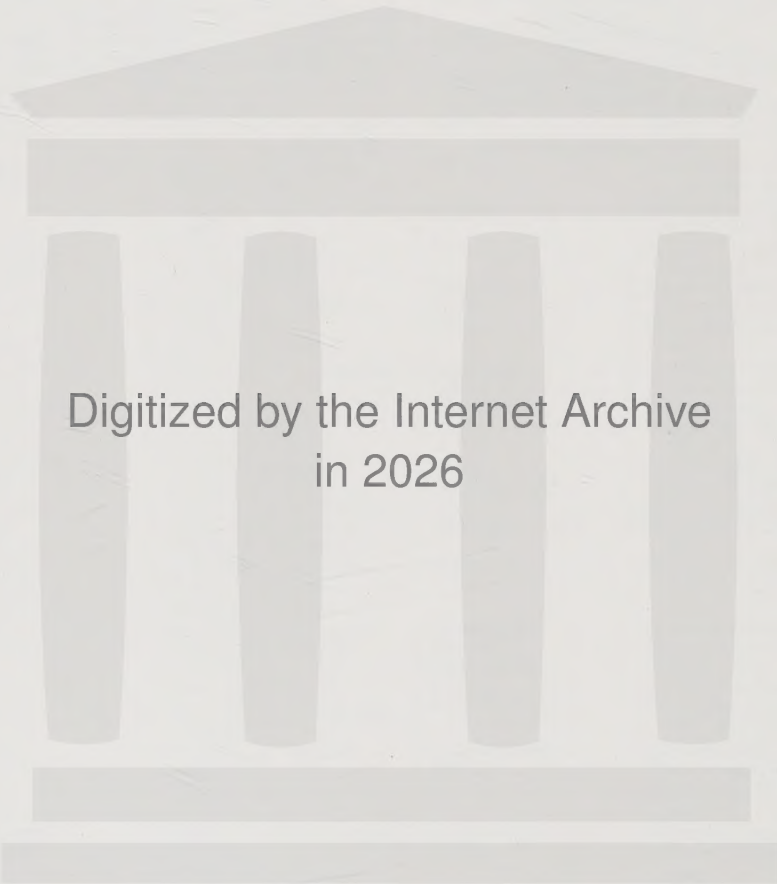
Doyen M. ZAMANSKY.

G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	PONCIN	T Mécanique générale.
DE BROGLIE	T Théories physiques.	DUBREIL	T Arithmétique et théorie des nombres.
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparées.	QUELET	T Chimie organique.
PÈRES	T Mécanique des fluides et applications.	CAGNIARD	T Géophysique appliquée.
GRASSÉ	T Evolution des êtres organisés.	CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire.
PRÉVOST	T Chimie organique.	CUVILLIER	T Micropaléontologie.
CHAUDRON	T Chimie appliquée.	JUNG	T Pétrographie.
WYART	T Minéralogie et Cristallographie.	TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique.
TEISSIER	T Zoologie.	WIEMANN	T Chimie organique structurale.
MANGENOT	T Biologie végétale (Orsay).	JACQUINOT	T Spectroscopie et physique céleste (Orsay).
AUGER	T Physique quantique et relativité.	VASSY	T Physique de l'atmosphère
MONNIER	T Physiologie générale.	DESTOUCHES	T Théories physiques.
PIVETEAU	T Paléontologie.	AMIEL	T Chimie génér.
ROCARD	T Physique (E.N.S.).	HOCART	T Minéralogie et Cristallographie.
CARTAN	T Mathématiques (E.N.S.).	J.-P. MATHIEU....	T Physique (Optique.)
LAFFITTE	T Chimie générale.	COUTEAUX	T Biologie animale (P.C.B.).
FAVARD	T Géométrie supérieure.	MAY	T Zoologie (Orsay)
COULOMB	T Physique du globe.	CHOQUET	T Théor. des fonct. et topologie.
M ^{lle} COUSIN	T Biologie anim. (S.P.C.N.)	FELDMANN	T Biologie végétale marine.
CHRÉTIEN	T Chimie minérale.	GUINIER	T Physique des solides (Orsay).
P. DRACH	T Zoologie.	JOST	T Physiol. comparée.
KASTLER.....	T Physique (E.N.S.)	FORTET.....	T Calcul des probabilités et Phys. math.
EPHRUSSI	T Génétique.	SCHWARTZ	T Calcul différentiel et intégral
RIVIÈRE	T Géologie (S.P.C.N.) et sédim.	CHOUARD	T Physiologie Végétale.
GAUTHERET	T Biologie végét. (P.C.B.).	MALAVARD	T Aviation (Tech. aéronaut).
LUCAS R.....	T Recherches physiques.	BRELOT.....	T Calcul différentiel et intégral
THOMAS A.	T Biologie cellulaire.	NORMANT.....	T Synthèse organique générale.
ARNULF	T Optique appliquée.	BENARD	T Chimie minérale.
MORAND.....	T Physique Enseignement.	BUVAT	T Botanique (E.N.S.)
SOLEILLET	T Physique. (P.C.B.)	DUGUE.....	T Statistiques Math.
FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides.	SOULAIRAC	T Psychophysiologie.
DANJON	T Astronomie.	ULRICH	T Physiol. végétale.
PETIT	T Biologie maritime.	MARÉCHAL	T Optique théorique et appl.
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique.	KIRRMANN	T Théories chimiques.
GALLIEN	T Embryologie	CHAEFAUD	T Botanique.
EICHHORN	T Botanique.	M ^{lle} LE BRETON..	T Physiologie de la nutrition.
DE CUGNAC	T Biologie végét. (S.P.C.N.)	SALEM.....	T Mathématiques générales.
M ^{lle} CAUCHOIS ..	T Chimie-Physique.	LELONG	T Application de l'analyse à la géométrie.
THELLIER	T Physique du Globe.		
L'HÉRITIER	T Biologie générale (Orsay).		
GRIVET	T Radioélectricité (Orsay).		

DEVILLERS.....	T Anatomie et Histologie comparées.	ROLLET.....	T Chimie (P.C.B.).
EHRESMANN.....	T Topologie algébrique	Mlle JOSIEN.....	T Chimie S.P.C.N.
FRANÇON.....	T Physique (S.P.C.N.).	CHEVALLEY.....	T Géométrie algébrique et théorie des groupes.
GLANGEAUD.....	T Géographie physique et Géologie dynamique.	ARNOULT.....	T Electronique (Orsay).
GODEMENT.....	T Mathématiques (M.P.C.).	CHAPELLE.....	T Physique (Orsay).
PISOT.....	T Technique mathématique de la physique.	DELANGE.....	T Mathématiques (Orsay).
ROCH.....	T Géologie.	DENY.....	T Mathématiques générales (Orsay).
SCHATZMANN.....	T Astrophysique.	GERMAIN P.....	T Mécanique théorique des fluides.
TERMIER.....	T Paléontologie stratigraphique.	LUCAS G.....	T Géologie.
ZAMANSKY.....	T Mathématiques générales.	ALLARD.....	T Chimie physique.
LENNUIER.....	T Physique (M.G.P.).	BERTHELOT.....	T Physique fondamentale des Hautes Energies (Orsay).
RIZET.....	T Génétique (Orsay).	BRICARD.....	T Météorologie et physique de l'atmosphère.
ROUTHIER.....	T Géologie appliquée.	Mme ALBE- FESSARD.....	Psycho-physiologie.
Mme TONNELAT.....	T Théories physiques.	FRIEDEL.....	Physique des solides (Orsay).
DIXMIER.....	T Mathématiques (M.P.C)	M. JULIA.....	Etudes des moléculaires naturelles complexes.
SOUCHAY.....	T Chimie générale	LENDER.....	T Biologie animale (S.P.C.N.) Orsay.
AIGRAIN.....	T Electrotechnique générale	MAGAT.....	Physico-chimie des radioéléments
BRUSSET.....	T Chimie systématique.	Mlle QUINTIN.....	T Electrochimie.
M. LÉVY.....	T Physique théorique des hautes énergies. (Orsay).	MONOT.....	T Chimie du métabolisme.
Mme CHAIX.....	T Chimie biologique.	BENOIT.....	T Physiologie animale (Orsay).
Mme HUREL-PY.....	Biologie végétale (P.C.B).	DE POSSEL.....	T Analyse numérique.
PIAUX.....	T Chimie (M.P.C.).	CHARLOT.....	T Chimie analytique.
BRUN.....	T Mécanique théorique des fluides.	HAISSINSKY.....	T Radiochimie.
LEDERER.....	T Chimie biologique.	LEMEE.....	T Physiologie B.M.P.V. (Orsay).
Mme DUBREIL.....	T Mathématiques (Agrégation)	GUERIN.....	T Chimie (M.P.C.) (Orsay)
Mme LELONG.....	T Mathématiques (E.N.S.)	CHATELET M.....	Chimie (P.C.B.)
BELLAIR.....	T Géologie (S.P.C.N.).	JEAN.....	T Physique nucléaire (Orsay)
COTTE.....	T Physique électricité.	MATTLER.....	T Physique (S.P.C.N.) (Orsay).
DUBOIS J.-E.....	T Chimie organique.	MICHEL L.....	Physique théorique des Hautes Energies (Orsay).
LAMOTTE.....	T Zoologie (E.N.S.).	BERGERARD.....	Zoologie (Orsay).
MICHEL A.....	T Chimie minérale (Orsay).	BERTEIN.....	Electronique (Orsay).
OLMER.....	T Energétique générale.	BOUSSIÈRES.....	Chimie des Radioéléments (Orsay).
ROUAULT.....	T Electricité (Orsay).	Mme COUTURE.....	Thermodynamique et Mécan. physique.
GAUTHIER.....	T Mécanique appliquée.	ELLENBERGER.....	Géologie appl. sur le terr.
BARCHEWITZ.....	T Chimie physique.	FRANC.....	Biologie animale (P.C.B.)
BROSSEL.....	T Physique atomique.	SCHNELL.....	Botanique tropicale (Orsay).
BUSER.....	Physiologie comparée.	STOLKOWSKI.....	Physiologie générale.
CAMUS.....	Physiologie végétale B.M.P.V.	ACHER.....	Chimie biologique (Orsay).
CASTAING.....	T Physique (Orsay).	BAUDOIN.....	Biologie animale (P.C.B.).
CURIEN.....	T Minéralogie et Cristallographie.	BFAUMONT.....	Biologie animale (S.P.C.N.).
MOYSE.....	T Physiologie végétale (Orsay).	BLAMONT.....	Géophysique Ionosphère.
NOIROT.....	Evolution des êtres organiques.	BOURREAU.....	Botanique.
PANNETIER.....	T Chimie générale (Orsay).	CURIE D.....	Physique (M.G.P.).
POSSOMPES.....	T Zoologie.	DURAND-DELGA.....	Géologie.
PULLMANN.....	T Chimie théorique.	FREON.....	T Chimie organique (Orsay).
TEILLAC.....	T Physique nucléaire et radioactivité.	HELLER.....	Physiologie végétale.
TONNELAT.....	T Biologie physico-chimique.	TORTRAT.....	Calcul des Probabilités.
VILLE.....	T Econométrie.		
WILLEMART.....	Chimie (P.C.B.).		
DODÉ.....	T Chimie Orsay.		
FREYMANN.....	T Recherches physiques.		
GUINOCHE.....	T Biologie vég. S.P.C.N. (Orsay).		

CAILLEUX	Géologie (S.P.C.N.).	LESIEUR	T Mathématiques (M.P.C.) (Orsay).
MAGNAN	T Physique (S.P.C.N.).	MAZET	T Mécanique générale (Orsay).
DAUDEL	T Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théor. et la Phys. nucléaire.	CAIRE	Géographie physique et Géologie dyn.
M ^{lle} FOURCROY	Biologie végétale (S.P.C.N.).	COMOLET	Mécanique des Fluides.
M ^{me} CHOQUET-BRUHATT	Méc. analytique et Méc. céleste.	GORABEUF	Physiologie animale.
M ^{lle} VIEL	Physiologie générale.	DELLOUE	Physique de l'Exosphère.
LWOFF	T Microbiologie.	GORENFLOT	Botanique II (Orsay).
SIESTRUNCK	T Mécán. physique et expérimentale.	HOULLON	Biologie animale (P.C.B.).
LACOMBE	T Métallurgie des métaux nucléaires.	JULLIEN J.	Chimie (P.C.B.).
BROCHARD	T Physique (P.C.B.) (Orsay).	MALGRANGE	Technique mathématique de la Phys.
CABANNES	T Mécanique générale.	OLIVIER	Anthropologie.
		NOZERAN	T Botanique II (Orsay).
		BLANC-LAPIERRE	Physique (E.N.S.) (Orsay).

Secrétaire Général R. POUILLAIN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MONSIEUR JACQUES TREFOUEL

DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR.

en témoignage de notre reconnaissance pour l'autorisation de travailler à l'Institut Pasteur et de profiter des installations et du matériel qui nous ont été nécessaires.

A MONSIEUR PIERRE GRABAR

DIRECTEUR DE L'INSTITUT DE RECHERCHES SCIENTIFIQUES
SUR LE CANCER DU C.N.R.S.

en témoignage de notre sentiment de profonde reconnaissance pour les précieux conseils et encouragements qu'il nous a donnés au cours de ce travail et pour l'accueil qu'il nous a réservé dans son service et l'affectueuse bienveillance qu'il n'a cessé de nous témoigner depuis lors.

A MONSIEUR WURMSER

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DES SCIENCES,
DIRECTEUR DE L'INSTITUT DE BIOLOGIE PHYSICO-CHIMIQUE.

*qui nous a fait l'honneur d'accepter
la présidence de cette thèse, en
témoignage de notre respectueuse
reconnaissance.*

A MADEMOISELLE LE BRETON

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DES SCIENCES,
DIRECTEUR DU CENTRE DE RECHERCHES
SUR LA CELLULE NORMALE ET CANCÉREUSE DU C.N.R.S.

*avec l'assurance de notre profonde
reconnaissance pour ses conseils
bienveillants et pour l'intérêt qu'elle
nous a toujours manifesté au cours
de ces recherches.*

A MONSIEUR ACHER

PROFESSEUR A LA SORBONNE.

*qui a bien voulu s'intéresser à
notre travail et nous faire d'utiles
suggestions, nous lui exprimons
nos sincères remerciements.*

Nous remercions tout particulièrement le Professeur KOURILSKY, le Professeur de SEZE et le Professeur MILLIEZ de nous avoir procuré les sérums pathologiques que nous avons étudiés ainsi que le Professeur SCHULTZE de Marburg de nous avoir donné certains antisérums de lapins et des préparations de glycoprotéines.

Nous remercions également, chaleureusement, la Croix Rouge hollandaise et le Professeur VAN LONGHEM de nous avoir envoyé des préparations d'albumine et de plasminogène humain.

Nous remercions chaleureusement tous nos camarades du service de Chimie-Microbienne qui, par leurs conseils, leur aide et leurs encouragements, ont contribué à ce travail.

Nous exprimons toute notre reconnaissance à Mesdemoiselles Janine COURCON, Berit LEMAIRE et Madame Janine SCHAFFNER pour leur assistance technique dévouée et compétente, à Madame de MOREE-CRIVEZ qui a dactylographié le manuscrit de ce travail avec beaucoup de gentillesse, à Monsieur Marcel CHALLEIL qui s'est chargé de l'immunisation des animaux et à tout le personnel technique du service.

TABLE DES MATIÈRES.

	Pages
<i>Introduction</i>	13
PREMIÈRE PARTIE.	
<i>Chapitre I</i>	15
Historique	15
<i>Chapitre II</i>	19
Matériel et Méthodes	19
1°) Sérum humain normal (S.H.N.)	19
Sérums Pathologiques	19
Protéines purifiées	19
Immunsérums de chevaux et de lapins	19
2°) Extrait trichloracétique du sérum humain	21
Extrait perchlorique du S.H.N.	21
3°) Electrophorèses en gélose	22
Immunoélectrophorèses	22
Colorations	23
4°) Chromatographie sur cellulose échangeuse d'ions.	24
5°) Dosages chimiques	25
<i>Chapitre III</i>	27
Caractérisation des constituants antigéniques dans les extraits perchloriques des sérums normaux et patholo- giques	27
a) Etude immunochimique et Electrophorétique du séromucoïde acide	27
1°) Calcul des mobilités des protéines du sérum hu- main normal	27
2°) Etude de l'extrait trichloracétique du S.H.N.	28
3°) Etude de l'extrait perchlorique du S.H.N.	29
4°) Mobilités électrophorétiques de différentes prépa- rations de séromucoïde acide	32
Discussion	34
b) Identification de certains constituants antigéniques dans les extraits perchloriques de sérums humains normaux et pathologiques	35
1°) La β_1 B-globuline ou hemopexine	35
2°) L'haptoglobine	38
3°) L' α_1 A-glycoprotéine	39
4°) La protéine ρ	40

5°) L'albumine	41
Discussion	45
c) Fractionnement des protéines perchlorosolubles sur diéthylaminoéthylcellulose	47
<i>Chapitre IV</i>	52
Mise en évidence dans les extraits perchloriques de sérums pathologiques de constituants antigéniques absents des sérums normaux	52
1°) Augmentation du taux des séromucoïdes dans cer- tains sérums pathologiques	52
2°) Mise en évidence de constituants antigéniques absents des extraits perchloriques normaux	56
3°) Les γ -globulines	57
4°) Augmentation du taux des protéines perchloroso- lubles après incubation des sérums pathologiques à 37°C	58
Discussion	59

DEUXIÈME PARTIE.

<i>Chapitre I.</i>	62
Historique	62
<i>Chapitre II</i>	68
Matériel et Méthodes	68
1°) Streptokinase	68
2°) Plasminogène	68
Préparation du Plasminogène	68
3°) Mesure de l'activité protéolytique de la plasmine .	69
4°) Mesure de l'activité estérasique de la streptokinase.	69
<i>Chapitre III</i>	71
Recherches sur les activités enzymatiques de la streptoki- nase et de la plasmine	71
1°) Rôle de la plasmine dans l'augmentation des pro- téines perchlorosolubles du S.H.N.	71
2°) Activité estérasique de la streptokinase	73
3°) Activité protéolytique de la plasmine vis-à-vis de la caséine et des γ -globulines	78
Discussion	80
<i>Résumé et Conclusions générales</i>	81
<i>Bibliographie : Première Partie</i>	83
Deuxième Partie	85

INTRODUCTION.

Les glycoprotéines solubles dans le surnageant de défécation du sérum humain normal par l'acide perchlorique à la concentration finale de 0,6 M ont été étudiées pour la première fois par WINZLER en 1948 [89]. Celui-ci a pu montrer qu'elles étaient hétérogènes en électrophorèse libre à pH acide car elles forment trois fractions MP1, MP2 et MP3. Le composé le plus important de la fraction MP₁ a été appelé orosomucoïde et étudié par WEIMER et coll. [83]. WINZLER a vu aussi que dans les sérums de malades atteints d'affections provoquant des destructions tissulaires, comme dans les cas de cancers, le taux des séromucoïdes perchlorosolubles était fortement augmenté [89].

L'analyse immunoélectrophorétique mise au point en 1953 par GRABAR et WILLIAMS [20] a permis de progresser dans la connaissance des séromucoïdes perchlorosolubles. Cette méthode qui combine les données de l'électrophorèse simple et les avantages de la spécificité des réactions antigènes-anticorps a rendu possible le dénombrement des protéines sériques et l'identification d'un grand nombre d'entre elles. On peut en effet dans une même expérience définir une protéine par sa mobilité électrophorétique, par sa spécificité immunologique et dans bien des cas par sa nature chimique soit à l'aide de colorants pour les lipoprotéines ou les glycoprotéines soit par des réactions enzymatiques pour les estérases, les catalases ou les enzymes protéolytiques par exemple.

Nous avons repris le travail au point laissé par WINZLER dans le but premièrement de dénombrer et d'identifier les glycoprotéines solubles dans l'acide perchlorique à partir de surnageants de défécation de sérums normaux et deuxièmement d'étudier le rôle des destructions tissulaires dans l'augmentation du taux de ces protéines perchlorosolubles dans les sérums pathologiques. Nous avons pu mettre en évidence que cette augmentation était influencée par deux phénomènes différents mais qui semblent évoluer de manière assez parallèle. En effet on observe d'une part l'élévation du taux des séromucoïdes sanguins qui serait due selon CATCHPOOL et coll. [7] à une dépolymérisation de la substance fondamentale du tissu conjonctif alors que MUSIL [45] pense qu'elle serait plutôt le résultat de la prolifération cellulaire. (Nos expériences paraissent confirmer les travaux de MUSIL). D'autre part on peut mettre en évidence dans ces mêmes extraits des protéines qui ne sont pas normalement solubles dans l'acide perchlorique. Cet acide s'est révélé être un solvant de choix pour des fragments de molécule ayant conservé encore une partie de leurs déterminants antigéniques. Cette propriété a permis de déceler pour

la première fois des processus de dégradation enzymatique des protéines sériques, dégradation qui se produit spontanément *in vivo* dans certains sérums pathologiques et dans les sérums normaux sous des conditions expérimentales que nous décrivons plus loin.

Nous avons été amené à étudier pour terminer l'action de la plasmine et des activateurs d'origines diverses sur l'allure de cette protéolyse.

Ce travail se divise en deux parties :

1^{re} Partie : Après l'historique (Chapitre I) et la description des méthodes utilisées (Chapitre II) nous caractérisons les différents constituants antigéniques solubles dans l'acide perchlorique. (Chapitre III) Ce chapitre se divise en trois parties : a) étude du séromucoïde acide, b) caractérisation de certains constituants antigéniques des sérums humains normaux et pathologiques et c) fractionnement sur diéthylaminoéthylcellulose des protéines perchlorosolubles. En analysant plus spécialement les extraits perchloriques de sérums pathologiques nous avons pu déceler la présence de constituants antigéniques absents des extraits perchloriques de sérums normaux. Nous avons pensé que l'on se trouvait en présence d'un phénomène enzymatique qui provoquait la dégradation de certaines protéines du sérum. (Chapitre IV) nous avons été amené à étudier le rôle de la plasmine dans cette dégradation.

2^e Partie : Activation du Plasminogène en Plasmine par la streptokinase et activité protéolytique de la Plasmine. Le Chapitre I comprend l'historique et la critique des résultats obtenus jusqu'à présent. Les méthodes sont décrites dans le chapitre II. Dans le chapitre III nous étudions l'activité estérasique de la streptokinase, et l'activité protéolytique de la plasmine sur différentes protéines sériques.

PREMIÈRE PARTIE.

CHAPITRE I.

Historique.

La présence dans le sérum de protéines riches en glucides a été découverte par FREUND en 1892 [15] dans la partie qui n'est pas coagulée par la chaleur. Le nom de séromucoïde a été donné à ce matériel par ZANETTI [94] en 1897 pour rappeler sa ressemblance avec l'ovomucoïde. Il a été ensuite étudié par BYWATERS [6] en 1909 et HEWITT [25] en 1936. C'est en travaillant à la purification de la sérumalbumine que HEWITT [25] prépara deux fractions riches en glucides : le séroglycoïde et le globoglycoïde. Le séroglycoïde était isolé du filtrat de précipitation des protéines sériques par le sulfate d'ammonium aux 2/3 de la saturation après acidification pour éliminer la sérumalbumine. HEWITT [26] obtient ainsi un glycoprotéide contenant 10 % de glucides. Il en reconnut les principales propriétés et constata sa stabilité vis-à-vis de la chaleur, des acides trichloracétique et phosphotungstique et de l'alcool. REMINGTON [57] en 1940 isolait un séromucoïde par précipitation alcoolique du filtrat de sérum préalablement porté à l'ébullition ; il obtenait une préparation hétérogène contenant 10 à 25 % de glucides. STAUB et REMINGTON [74] en 1948 montrèrent l'hétérogénéité de cette préparation en électrophorèse de zone, hétérogénéité qui est mise facilement en évidence à des pH acides. On sait actuellement que le séroglycoïde de HEWITT et le séromucoïde de REMINGTON avaient comme point commun de contenir de l'orosomucoïde en quantité variable. WINZLER en 1948 [89] déprotéinisa le sérum par l'acide perchlorique 0,6 M. et trouva dans le surnageant un matériel assez identique auquel il donna le nom de séromucoïde. Il en reconnaît l'hétérogénéité par étude à l'électrophorèse libre à pH acide car il trouve trois composants chargés négativement, migrant vers l'anode et appelés MP_1 , MP_2 , MP_3 . Le composé principal de la fraction MP_1 a été identifié à l'orosomucoïde et décrit par WEIMER et coll. en 1950 [83].

Les séromucoïdes ou glycoprotéines sériques sont mal connus du double point de vue de leur composition et de leur structure. Le galactose, le mannose, le fucose, la glucosamine ont été caractérisés et dosés par des réactions spécifiques et par chromatographie sur papier. WERNER [85], WERNER et ODIN [86] ont mis en évidence la présence d'acide sialique. Les proportions moléculaires relatives des différents

oses sont très variables et il faut considérer comme un postulat le concept de la répartition équimoléculaire des constituants glucidiques.

Voici maintenant d'après une revue générale de WINZLER [91] les principales caractéristiques chimiques des protéines dont nous avons montré la solubilité dans l'acide perchlorique 0,6 M.

a) La Protéine ρ ou protéine riche en tryptophane.

Une protéine migrant plus rapidement que l'albumine a été mise en évidence dans les sérums normaux, dans le liquide cérébrospinal et dans les sérums pathologiques. Elle a été isolée du plasma par SCHULTZE et coll. [63] par précipitation saline, adsorption sur hydroxyde d'alumine et électrophorèse de zone. Sa mobilité électrophorétique est de 9×10^{-5} cm²/volt, sec. c'est-à-dire qu'elle est environ de 50 % plus rapide que l'albumine à pH 8,6. Sa rapidité doit dépendre de sa composition en acides aminés car les dosages de sulfates, phosphates, d'acide uronique et d'acide sialique sont négatifs. Elle est caractérisée par sa teneur importante en tryptophane (25-27 %). Elle est souvent dénommée « préalbumine riche en tryptophane » et SCHULTZE [63] a démontré son identité immunochimique avec la protéine ρ de GRABAR [17]. Son poids moléculaire mesuré par sa constante de sédimentation et par diffraction de la lumière est de 61.000. Elle contient des quantités appréciables d'hexoses (1,1 % déterminé par la méthode à l'orcinol) mais peu d'hexosamine (0,15 %). On n'a pu mettre en évidence ni fucose ni acide sialique. Sa composition en glucides est très différente de celle de la majorité des autres glycoprotéines à cause du rapport très bas des hexosamines sur les hexoses, de l'absence d'acide sialique. Le taux de cette protéine dans le sérum est très faible environ 30 mg pour 100 ml et on ne connaît pas encore son rôle physiologique.

b) Le séromucoïde acide.

Le séromucoïde acide [81] ou orosomucoïde [83] ou α_1 séromucoïde acide [62] est une glycoprotéine acide et une des mieux connue du sérum sanguin. Elle a été isolée en même temps par SCHMID [60] et par WEIMER et coll. [83] et a été étudiée par SCHULTZE [62, 63] SMITH et coll. [70] et POPENOE et DREW [55].

C'est une protéine de faible poids moléculaire, 44.000 et de point isoélectrique très bas 1,8 à 2,7 suivant les tampons ; elle résiste à la chaleur et aux acides forts, elle ne précipite ni à l'ébullition ni par les acides perchlorique, trichloracétique ou sulfosalicylique. Elle précipite par l'acide phosphotungstique, l'acétate d'urane et le sulfate d'ammonium au-dessus de 70 % de saturation. Il semble que sa grande stabilité soit due à sa teneur élevée en glucides : les hexoses, les hexosamines, l'acide sialique et le fucose forment 41 % de la masse totale de la protéine. Les hexoses (15 %) sont composés entièrement de galactose et de mannose dans le rapport 2 à 1 [62, 63]. Les hexosamines (12 % de la protéine totale) sont uniquement de la galactosa-

mine [47, 93] probablement sous forme de dérivé N-acétylé. Le dosage, différent suivant les auteurs [62, 63, 90, 93], donne des chiffres compris entre 0,7 et 1,4 %. L'acide sialique (10,1 %) est présent sous la forme d'acide N-acétyl-neuraminique [47].

L'acide sialique dans le séromucoïde semble se trouver entièrement en position terminale avec les groupements carboxyliques libres. POPPENOE et DREW [55] ont montré que lorsqu'on traite le séromucoïde avec l'enzyme RDE du *Clostridium perfringens* on libère 16 molécules d'acide sialique et le changement dans la courbe de titration correspond à la perte de 16 groupements carboxyliques. Le point isoélectrique de la molécule change également et passe de pH 2,7 à pH 5 (SCHULTZE et SCHWICK [64]). La mobilité électrophorétique varie également après traitement par les acides dilués (0,01 M) la liaison entre l'acide sialique et le reste de la molécule est très labile sous l'action des acides. Le fucose est clivé très rapidement du reste de la molécule ce qui laisse supposer qu'il occupe également une position terminale.

La trypsine et les enzymes protéolytiques n'attaquent pas le séromucoïde acide mais dès que l'acide sialique est hydrolysé par un acide faible ou clivé par un enzyme, le reste de la molécule est digéré par la trypsine. Ceci a permis l'étude de la structure de la molécule à partir des peptides obtenus [92].

Le séromucoïde acide migre comme une α_1 -globuline à pH 8,6 sur papier et en électrophorèse libre, mais à pH 4,5 il migre en avant des autres protéines vers l'anode et forme le pic M_1 [41].

Sa signification physiologique est encore inconnue. BOSTROM et coll. [4] ont étudié chez le Cobaye une fraction glycoprotéique qui correspond au séromucoïde acide. Ils ont montré que du glucose marqué, administré aux cobayes, se retrouve très rapidement dans la fraction glucidique de la molécule et qu'il disparaît aussi très vite ce qui laisse supposer un temps de demi-vie de 1 à 2 jours.

L' α_1 A-glycoprotéine.

SCHULTZE et coll. [62] ont isolé une autre glycoprotéine du sérum humain différente du séromucoïde acide. C'est également une protéine de faible poids moléculaire 54.000, de constante de sédimentation $S_{20} = 3,5$. Sa teneur en glucides est nettement plus faible : 6,8 % d'hexoses, 3,6 % d'hexosamines, 3,3 % d'acide sialique. On ne sait pas grand chose de plus sur cette glycoprotéine.

L'haptoglobine.

POLONOWSKI et JAYLE en 1938 et en 1939 [52, 53] ont remarqué que le sérum contenait un facteur qui en présence d'hémoglobine avait une activité oxydasique à pH 4,4. JAYLE, BOUSSIER et coll. [28, 29, 30, 31, 32] ont isolé cette protéine et l'ont nommée haptoglobine.

JAYLE et coll. [23, 29] ont isolé d'abord l'haptoglobine d'une urine d'enfant néphrotique par fractionnement au sulfate d'ammonium.

On trouve dans le sérum 0,8 % de cette glycoprotéine dont le poids moléculaire est de 85.000 pour la forme monomère et 169.000 pour la forme dimère. Sa constante de sédimentation est de $S_{20} = 4,1$; les hexoses et hexosamines formant 17 % du poids total de la protéine, qui contient aussi 5,5 % d'acide sialique et 0,18 % de fucose. Le galactose et le mannose se trouvent dans le rapport 1 : 1.

SMITHIES a décelé avec les techniques d'électrophorèses en gel d'amidon trois types d'haptoglobines et il admet que les humains peuvent être divisés en trois groupes sériques déterminés par la présence de 2 gènes Hp_1 et Hp_2 . L'haptoglobine est considérée comme le transporteur de l'hémoglobine dans le plasma [36, 37] ; elle augmente dans certains cas pathologiques [29, 37].

La β_1 -B-globuline.

Cette protéine n'était connue jusqu'à présent que par la ligne de précipitation qu'elle forme dans la zone des β_1 -globulines avec la plupart des immunsérums de chevaux. Elle a été étudiée par BISERTE [2] et GRABAR et nous-mêmes [19] qui ont montré son rôle de transporteur des hémoprotéines.

CHAPITRE II.

Matériel et Méthodes.

I. MATÉRIEL.

1) Sérum humain normal.

Le sérum humain normal provient de donneurs de l'Institut Pasteur ou du Centre de Transfusion Sanguine. Le sang est recueilli sans anticoagulant et prélevé après rétraction du caillot.

2) Sérums pathologiques.

Les sérums pathologiques proviennent de différents services hospitaliers de Paris, ceux de malades atteints de cancer du poumon ou de tuberculose, du service du Professeur KOURILSKY. Les sérums de polyarthrite chronique évolutive viennent du service du Professeur de SEZE et les autres (affections variées) du service du Professeur MILLIEZ.

3) Glycoprotéines purifiées.

Nous avons utilisé la fraction α_1 (2,9-223/224) préparée par le Professeur SCHULTZE [62] et désignée par lui sous le nom de « α_1 -séromucoïde » ou « protéine acide α_1 , de faible poids moléculaire », et la fraction VI-I préparée par le Dr SCHMID [60] pour identifier la protéine X du sérum total.

4) Sérumalbumine humaine.

Nous avons utilisé une sérumalbumine humaine préparée par la méthode de COHN (fraction V) et obligeamment fournie par la Croix Rouge Hollandaise. Une solution de sérumalbumine étudiée par l'analyse immunoélectrophorétique montrait, en plus du trait de précipitation de la sérumalbumine elle-même, deux faibles lignes dues à la présence de traces d' α_1 et α_2 -globulines (environ 2 à 5 %).

5) Les Immunsérums.

Nous avons utilisé successivement :

a) Un sérum de mulet (N° 282) immunisé contre un mélange de sérums humains normaux. Cet antisérum donne en immuno-électrophorèse 28 à 30 lignes de précipitation contre le sérum humain normal, parmi celles-ci 14 d'entre elles ont été identifiées [18] (voir tableau I) (fig. 1).

TABLEAU I.
Protéines sériques identifiées avec l'immunsérum 282.

Zones de mobilités électrophorétiques	Protéines
γ	les γ -globulines
β_2	la β_2 A-globuline la β_2 -macroglobuline
β_1	la sidérophiline la β_1 B ou hémopexine la β_1 A et C qui est une fraction du complément
α_2	la céruloplasmine l'haptoglobine l' α_2 macroglobuline la lipoprotéine lente
α_1	l' α_1 A-glycoprotéine
Albumine	l'albumine le séromucoïde acide la lipoprotéine rapide

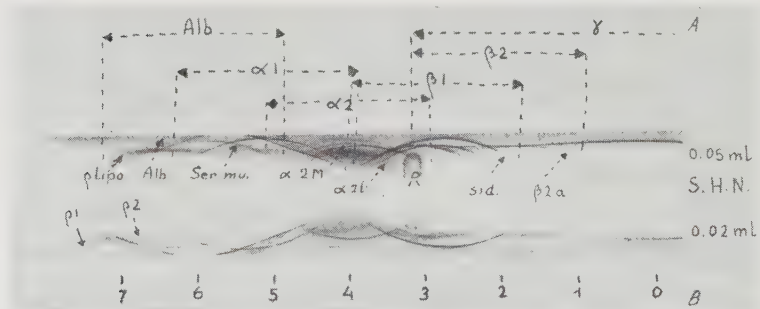


FIG. 1. — Diagrammes immunoélectrophorétiques d'un sérum humain normal (S.H.N.) à deux concentrations différentes, révélé par l'immunsérum de mulet 282.

R = réservoir de départ.

A = zones de migrations électrophorétiques.

B = unités de mobilités électrophorétiques définies par URIEL.

b) Un immunsérum de cheval (N° 32) immunisé contre un mélange de sérums humains normaux. Cet immunsérum révèle pratiquement les mêmes constituants antigéniques que l'immunsérum 282 et il donne en

plus une ligne de précipitation avec la protéine ζ ou « protéine riche en tryptophane » des auteurs allemands [63]. Cette protéine ζ avait été vue pour la première fois avec un autre immunosérum de cheval (GRABAR [17]).

c) Un immunosérum de cheval (N° 1299) antisérum humain normal. Celui-ci ne révèle dans la zone des β_1 -globulines que la β_1 -A-globuline.

d) Un sérum de lapin spécifique anti-protéine ζ . Ce sérum nous a été obligeamment fourni par le Professeur SCHULTZE.

e) Un sérum de lapin préparé par nous-même contre un mélange de protéines urinaires provenant de malades atteints de cancer bronchique. Cet immunosérum est surtout intéressant pour étudier les γ -globulines dégradées.

II. MÉTHODES.

1) Préparation des extraits trichloracétiques et perchloriques du sérum humain normal.

a) EXTRAIT TRICHLORACÉTIQUE (E.T.).

Un volume de sérum humain normal (S.H.N.) est dilué par 4 volumes d'eau bidistillée (pour éviter une trop grande rétention de glycoprotéines sur le précipité), puis traité par 5 volumes d'acide trichloracétique à 10 %. Toutes les manipulations sont faites à froid et le temps de contact avec l'acide est aussi court que possible, c'est-à-dire qu'entre le début de la précipitation et la fin de la neutralisation il y a environ 30 minutes — (ceci vaut également pour les précipitations avec l'acide perchlorique). Après centrifugation le surnageant est neutralisé par de la soude jusqu'à pH 7 (il est très important de ne pas dépasser ce pH car ces glycoprotéines sont dénaturées en milieu alcalin) puis dialysé contre de l'eau bidistillée. On ajoute une quantité de ClNa calculée de telle façon que la concentration saline finale soit de 8,5 ‰. Le surnageant est concentré, sous vide à 37° dans un évaporateur rotatif. Le volume final est ramené à 1/10 du volume initial du sérum.

Une partie de cette solution est précipitée par l'alcool à 90°. Après une nuit à la glacière, le précipité formé est centrifugé puis séché par lavage à l'alcool absolu et à l'éther. La fraction ainsi obtenue se conserve très bien à l'état de poudre à 4°C. Elle contient la fraction que GRABAR [17] a désignée par la lettre X, et, dissoute dans la solution physiologique, nous sert de solution étalon.

b) EXTRAIT PERCHLORIQUE (E. P.). (D'après la méthode de WINZLER modifiée car la précipitation par l'acide phosphotungstique est supprimée).

Une quantité de sérum humain normal est diluée 9 fois avec de l'eau bidistillée puis précipitée par 5 volumes d'acide perchlorique 1,8 M. L'extrait perchlorique (E.P.) s'obtient ensuite par les méthodes employées pour la préparation de l'extrait trichloracétique.

2) Techniques en gélose.

a) PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE EN MILIEU GÉLOSÉ.

Nous avons utilisé la méthode par double diffusion d'OUCHTERLONY [48] dans les conditions décrites par M^{me} KAMINSKI [34]. Les différents produits à comparer sont disposés dans des réservoirs rangés perpendiculairement à celui contenant l'immunsérum.

On peut conclure à l'identité immunochimique totale des protéines analysées lorsque leurs traits de précipitation confluent exactement.

b) ELECTROPHORÈSES SIMPLES.

1) Les électrophorèses simples sont effectuées dans un gel de gélose (agar-agar) à 1 % coulé sur des plaques de verre photographique sans défaut. La gélose à cette dilution forme un gel suffisamment élastique et transparent ; elle contient 99 % de tampon véronal sodique de force ionique 0,025 et de pH 8,2. Dans ces conditions expérimentales, la mobilité relative des protéines sériques est la même que dans l'électrophorèse en phase liquide.

La durée de l'électrophorèse est de une heure quinze pour les plaques de dimensions suivantes 9×12 , 18×10 et $4,5 \times 10$ et de quatre heures pour celles de 18×24 . Lorsqu'on applique aux électrodes une différence de potentiel de 100 volts on a un champ de 3 à 6 volts par cm suivant la dimension des plaques.

L'électrophorèse terminée, les protéines sont précipitées par un bain d'acide acétique à 2 % pendant quatre heures environ ; les glycoprotéines sont fixées par un bain d'alcool à 60 % contenant 5 % d'acide acétique. Elles sont ensuite séchées dans une étuve à 37°C, puis colorées.

2) Coloration des protéines (selon URIEL et GRABAR) [78].

Les protéines fixées dans le film de gélose séchée sont colorées par immersion dans une solution d'amidoschwartz à 1 pour 1000 dans du tampon acétate pH 3,6 et 0,05 M.

3) Coloration des glycoprotéines.

Les glycoprotéines sont colorés (URIEL et GRABAR [79]) par la réaction acide périodique-formazan basée sur l'obtention à partir des arylhydrazones des glycoprotéines, de dérivés formazylés sous forme de complexes cuivriques. Ces complexes insolubles et fortement colorés remplissent les conditions requises pour une réaction de caractérisation en électrophorèses de zone.

c) L'ANALYSE IMMUNOELECTROPHORÉTIQUE.

1) L'analyse immunoélectrophorétique est basée sur deux propriétés différentes des protéines : leurs propriétés électrochimiques qui assurent leur dispersion dans un champ électrique et leurs propriétés antigéniques qui expliquent leur précipitation spécifique avec les anticorps. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir réunir les deux opérations dans un même milieu. Toutes les immunoélectrophorèses ont été effectuées selon la méthode décrite par GRABAR et WILLIAMS [20] et dans les mêmes conditions que les électrophorèses

simples. Aussitôt après l'électrophorèse, on découpe dans le gel un canal parallèle au sens de la migration sur presque toute la longueur de la plaque. Ce canal est évidé et rempli par l'immunsérum choisi. Il se forme des complexes insolubles qui précipitent sous forme d'arcs plus ou moins ellipsoïdaux, par diffusion des protéines de l'échantillon analysé et des protéines-anticorps de l'immunsérum.

2) *Les colorations.*

Les modalités d'application des réactions de caractérisation par coloration sont les mêmes que celles décrites plus haut pour l'électrophorèse simple. Nous avons employé, en plus la coloration à la benzidine pour mettre en évidence les complexes β_1 B-hémoglobine et haptoglobine-hémoglobine selon la technique décrite par HIRSCHFELD [27]. Avant l'électrophorèse on ajoute une goutte d'hémoglobine au sérum humain ou à un extrait perchlorique de sérum. Après lavage et séchage, les plaques d'immunoélectrophorèses sont plongées dans une solution saturée de benzidine dans de l'acide acétique à 10 % et contenant de l'eau oxygénée. Les traits de précipitation dus aux protéines ayant fixé l'hémoglobine se colorent en bleu.

3) *Emploi de l'immunsérum épuisé par un ou plusieurs constituants antigéniques.*

Lorsque l'immunsérum est épuisé par un (ou plusieurs) constituant antigénique, il se forme après un certain temps, un complexe insoluble que l'on centrifuge. L'immunsérum se trouve ainsi privé de l'anticorps correspondant à la protéine qui a servi à l'épuisement et dans le diagramme de l'échantillon à analyser il manque un trait de précipitation (ou plusieurs si l'on a employé un mélange complexe comme l'extrait perchlorique total, par exemple) par rapport au même diagramme révélé par l'immunsérum total. Cette méthode a permis de caractériser un certain nombre de protéines présentes dans les extraits perchloriques ou trichloracétiques.

On met dans un tube à centrifugation l'immunsérum et les protéines en quantités telles que l'on se trouve au point d'équivalence*. L'absorption se fait en laissant en contact l'immunsérum et la protéine une heure à 37°C et une nuit à la glacière. Le lendemain, le précipité formé est centrifugé et la qualité de l'épuisement est vérifiée par l'épreuve du disque ou ring-test.

Les protéines suivantes ont été employées pour épuiser les anticorps de l'immunsérum 282 : l'albumine, à raison de 800 μ g d'albumine par ml de 282, le séromucoïde acide (250 μ g par ml de 282) les γ -globulines humaines (700 μ g par ml de 282), l'extrait perchlorique normal (0,2 ml d'extrait pour 0,6 ml de 282) et l'extrait perchlorique pathologique (0,2 ml d'extrait pour 0,6 ml de 282).

Certaines protéines, telles que les macroglobulines, la β_2 A-globuline, les β_1 A-globulines et l'haptoglobine sont absentes du sérum de

(*) Le point d'équivalence est atteint lorsque le surnageant après centrifugation du précipité antigène-anticorps ne réagit plus lorsqu'on ajoute une petite quantité soit de l'antigène soit de l'anticorps.

cordon ombilical. On se sert de ce sérum pour épuiser l'immunsérum N° 32 antisérum humain total qui révèle par la suite uniquement la β_1 B-globuline, l'haptoglobine et une α_2 -globuline du sérum humain normal. Les complexes β_1 B-hémoglobine et haptoglobine-hémoglobine ont été étudiés par cette méthode dans le sérum humain normal et dans les extraits perchloriques de sérums.

Dans les cas où, avec un même extrait protéique nous avons dû employer à la fois l'immunsérum total et le même immunsérum absorbé par une protéine, le gel a été séparé après électrophorèse, par une gouttière large de 3 mm, parallèle aux réservoirs contenant les immunsérums, et également distante de chacun d'eux afin d'éviter les diffusions latérales de ces sérums qui pourraient provoquer des précipitations. Si l'antigène se trouve, éventuellement, en léger excès dans les sérums épuisés, les anticorps du sérum total peuvent réagir avec cet antigène pour donner un trait supplémentaire de précipitation, ce qui risquerait de fausser l'interprétation des résultats.

4) *Chromatographie sur diéthylaminoéthyl cellulose (DEAE).*

La chromatographie sur cellulose échangeuses d'ions s'est développée depuis les travaux de SOBER et PETERSON [72] qui ont montré que ces celluloses ont une grande capacité d'absorption des protéines pour des forces ioniques faibles et que la désorption se fait quantitativement (et très facilement) par augmentation de la force ionique ou abaissement du pH. L'augmentation de la force ionique semble favoriser la rupture des liaisons électrostatiques entre les protéines et l'absorbant ; par contre la variation du pH doit entraîner une variation des charges tant de la protéine que de la cellulose. Suivant les cas, l'élution peut se faire avec un pH constant et une force ionique croissante ou avec un pH et une force ionique croissants.

Les celluloses échangeuses d'ions sont préparées par la réaction appropriée d'un dérivé halogène sur l' α -cellulose. La diéthylamino-éthylcellulose (DEAE) est obtenue par traitement avec le chlorhydrate du 2-chloroéthyl-diéthylamino-éthanol. Elle est à 0,9 mEq/gm et peut absorber les 3/4 de son poids d'albumine bovine cristallisée.

Le produit à analyser est dialysé contre le tampon de faible molarité pendant 24 heures avant d'être fixé sur la cellulose équilibrée avec ce même tampon. Toute l'expérience est faite dans les conditions décrites par SOBER et PETERSON [72] : 2 g de cellulose sont versés dans un tube de verre de 40 cm de long et de 8 mm de diamètre entouré d'un manchon de verre pour permettre un refroidissement. Une solution contenant au total 50 à 100 mg de protéines est fixée sur la cellulose puis éluee de différentes manières.

1) par le mélange de 125 ml de tampon phosphate (K_2HPO_4 , KH_2PO_4) de molarité 0,005 et de 125 ml du même tampon mais de pH 5,5 et de molarité 0,3.

2) par un mélange de 125 ml de tampon acétate ($CH_3COOH + CH_3COONa$) de pH 6 et de molarité 0,01 (en Na +) et de 125 ml du même tampon mais de pH 4 et de molarité 0,3.

Dans les deux cas, le liquide effluent est recueilli par fractions de 5 ml et son contenu en protéines est évalué par l'absorption à 280 m μ .

3) L'élution a été faite dans le troisième cas par une série de tampons acétate de force ionique croissante et de pH décroissant. Le passage d'un tampon à l'autre ne se fait que lorsque l'absorption à 280 m μ est presque nulle ce qui signifie que toutes les protéines ont été éluées dans ces conditions de pH et de molarité.

Le tableau II donne les différents tampons employés dans ce dernier cas.

TABLEAU II.
*Tampons acétate
employés pour éluer les protéines perchlorosolubles.*

N°	pH	Molarité en Na ⁺	Force ionique
1	5,6	0,010	0,01
2	4,8	0,025	0,025
3	4,6	0,05	0,05
4	4,3	0,1	0,1
5	4,0	0,125	0,125
6 + NaCl 0,5 M	4,0	0,125	0,625

5) Dosages chimiques.

a) MESURE DE LA QUANTITÉ DE PROTÉINES.

Dans nos échantillons, la quantité de protéines a été évaluée par rapport à une courbe de référence établie avec de l'albumine humaine avec le réactif de biuret de WEICHSELBAUM modifié par DITTER-BRANDT [12]. Les mesures ont été faites à 555 m μ .

b) MESURE DE LA QUANTITÉ D'ALBUMINE.

L'albumine est dosée par la fixation et par le déplacement du spectre de l'éosine suivant la technique décrite par MAY [40]. On mesure la densité optique du mélange albumine-éosine à 516 m μ et à 536 m μ . On calcule $= d_{516} - d_{536}$ et il suffit de se rapporter à la courbe étalon pour trouver la valeur correspondante x. La concentration C en albumine est donnée par la formule :

$$C \text{ (mg/ml)} = 0,44 \text{ x.}$$

c) DOSAGE DES HEXOSES.

Le dosage des hexoses a été effectué par la méthode à l'anthrone [43]. Une partie aliquote du filtrat est amenée à 1 ml, plongée dans un bain glacé ; on y ajoute 2 ml d'une solution d'anthrone (Light ou Kodak) à 0,2 % dans de l'acide sulfurique concentré (Merck). On porte ensuite les tubes dans un bain-marie bouillant pendant 15 minutes, puis on les refroidit dans de la glace et l'on effectue les lectures à 540 m μ au spectrophomètre Unicam SP 600. Une gamme témoin

de 10, 20, 50 et 100 μg d'un mélange équimoléculaire de galactose-mannose est faite avec chaque série de dosages.

d) DOSAGE DE L'ACIDE SIALIQUE.

Le dosage de l'acide sialique est effectué selon une modification de la méthode de SVENNERHOLM [75] au résorcinol-cuivre. Les résultats sont calculés par rapport à une courbe d'étalonnage obtenue avec o-sialique (généreusement mis à notre disposition par le Professeur BLIX).

CHAPITRE III.

Caractérisation des constituants antigéniques dans les extraits perchloriques des sérums normaux et pathologiques.

a) Etude immunologique et électrophorétique du séromucoïde acide.

Dans une première étude sur les protéines du sérum sanguin qui ont une mobilité du même ordre que celle de la sérumalbumine, GRABAR [17] avait désigné par lettre X, un de ces constituants. C'est à l'étude de cette protéine que nous nous sommes d'abord intéressé car nous avons pu montrer qu'elle se trouve en quantité importante dans le surnageant de défécation du sérum sanguin par les acides trichloracétique et perchlorique.

Avant d'étudier cette protéine, nous voudrions tout d'abord montrer un diagramme immunoélectrophorétique du sérum humain normal révélé par l'immunsérum de cheval N° 282 (figure 1) et donner un tableau (tableau III) des zones de mobilités relatives des protéines séri-

TABLEAU III.

*Valeurs moyennes des mobilités électrophorétiques
relatives ($U_x/U_{alb.}$) des protéines du sérum humain normal.*

Zones de migration	p_1 et p_2	Alb.	α_1	α_2	β_1	β_2	γ
Electrophorèse en gélose (URIEL)..	1,15	0,97	0,84	0,86	0,51	0,37	0,15
Electrophorèse en gélose (WIEME).	1,19	0,98	0,86	0,67	0,47	0,40	0,11
Electrophorèse libre (DOLE).....		1	0,85	0,68	0,48		0,16

ques dans le gel de gélose. Celles-ci ont été calculées par URIEL [76] d'après les données de distributions établies préalablement sur les diagrammes électrophorétiques et immunoélectrophorétiques du sérum humain normal en se servant d'une préparation de sérumalbumine humaine comme protéine de référence. On peut remarquer que les

valeurs calculées par URIEL sont en accord avec celles obtenues par WIEME [87] qui utilise la micro-méthode d'électrophorèse sur gélose et par DOLE [13] à l'aide de l'électrophorèse libre.

1) ETUDE DE L'EXTRAIT TRICHLORACÉTIQUE DU SÉRUM HUMAIN NORMAL.

L'extrait trichloracétique du sérum humain normal est préparé selon la méthode décrite ci-dessus ; son étude par l'analyse immuno-électrophorétique a été assez difficile car la principale protéine qu'il contient est mauvais antigène. On trouve rarement des anticorps contre cette protéine dans les immunsérums de lapins, antisérum humain normal et dans peu d'immunsérums de chevaux, le meilleur est l'immunsérum de mulet 282.

Le diagramme immunoélectrophorétique (fig. 2 et 3) d'un extrait trichloracétique révélé par l'immunsérum 282 montre une ligne de précipitation dans la zone de l'albumine. Deux impuretés qui n'ont pas été identifiées donnent deux petits traits flous, l'un dans la zone des α_1 -globulines (0,84) et l'autre dans celle des albumines (0,97).

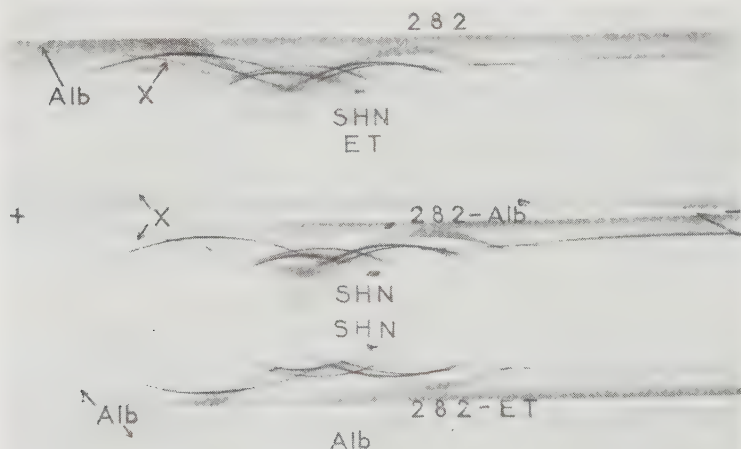


FIG. 2. — Mise en évidence du trait de précipitation dû à la protéine X de l'extrait trichloracétique dans le diagramme du sérum humain à l'aide de l'immunsérum 282 total et absorbé successivement par l'albumine (282 - Alb) et par l'extrait trichloracétique (282 - ET).

SHN = sérum humain normal.

ET = extrait trichloracétique.

Alb = albumine.

2) IDENTITÉ IMMUNOCHIMIQUE DE LA PROTÉINE X ET LA PROTÉINE SOLUBLE DANS L'ACIDE TRICHLORACÉTIQUE.

Lorsque le sérum humain normal est révélé par l'immunsérum 282, on remarque dans la zone de l'albumine (0,97) (fig. 2) deux lignes de

précipitation distinctes mais de mobilité très voisines car elles sont presque confondues à leurs extrémités vers l'anode. La plus importante est formée par la précipitation de la sérumalbumine car elle disparaît lorsque le sérum sanguin est révélé par le 282 absorbé par de l'albumine humaine. La disparition du trait de précipitation de l'albumine permet de mieux distinguer celui dû à la protéine X : dans ces conditions, il a une mobilité légèrement supérieure à celle de l'albumine. C'est cette protéine X qui se solubilise dans l'acide trichloracétique car elle est absente d'un diagramme du sérum humain normal, révélé par le 282, absorbé par l'extrait trichloracétique.

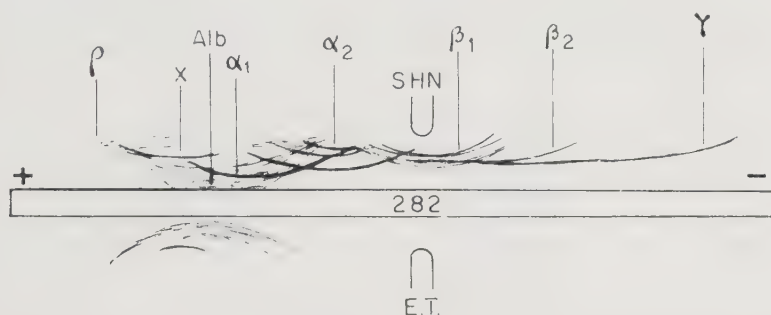


FIG. 3. — Schéma des diagrammes immunoélectrophorétiques du sérum humain normal (SHN) et des protéines de l'extrait trichloracétique (E.T.) révélés par l'immun-sérum 282.

3) MISE EN ÉVIDENCE DE LA PROTÉINE X DANS LES EXTRAITS PERCHLORIQUES D'UN SÉRUM HUMAIN NORMAL.

Le diagramme immunoélectrophorétique d'un extrait perchlorique d'un sérum humain normal montre, lorsqu'il est révélé par l'immun-sérum 282, cinq traits principaux de précipitation : (fig. 4) un dans la zone des β_1 -globulines (0,51), un dans la zone de α_2 -globulines, (0,86)

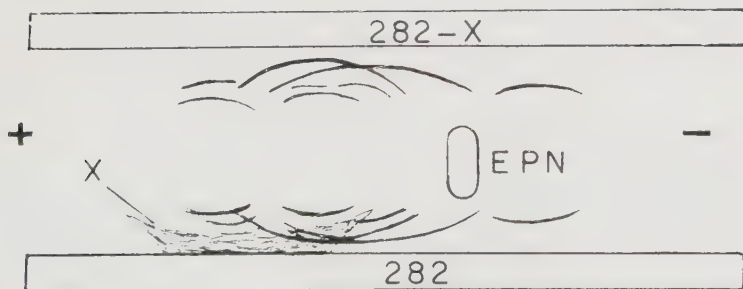


FIG. 4. — Schéma du diagramme immunoélectrophorétique des protéines de l'extrait perchlorique (E.P.) d'un sérum humain normal révélé par l'immun-sérum 282 et par le même immun-sérum absorbé par la protéine X.

un dans la zone des α_1 -globulines (0,84) et deux dans la zone de l'albumine (0,97), l'un très important et l'autre faible. Dans la zone comprise entre les β_1 et les α_1 -globulines (entre 0,51 et 0,86) il y a, en plus, une série de traits de précipitation qui n'ont pas encore été identifiés car ils s'y trouvent à l'état de traces.

Lorsque l'extrait perchlorique est révélé par le 282 absorbé par la protéine X de l'extrait trichloracétique, c'est le trait de précipitation le plus important de la zone de l'albumine qui disparaît. C'est cette protéine X qui forme donc, le constituant principal de l'extrait perchlorique.

Lorsque les extraits perchloriques et trichloracétiques sont étudiés à différentes dilutions par la méthode de double diffusion en gélose, on voit (fig. 5) qu'il se forme un trait continu de précipitation d'un

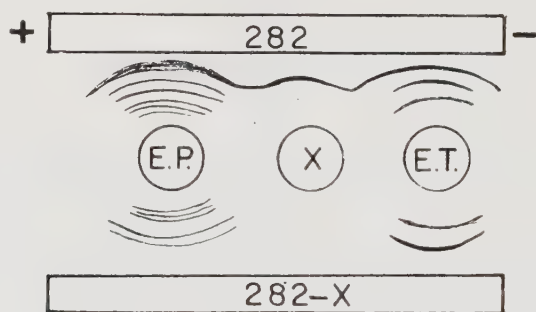


FIG. 5. — Schéma d'une diffusion double en gélose pour montrer l'identité immunochimique de la protéine X dans l'extrait trichloracétique (E.T.) et perchlorique (E.P.).

bout à l'autre de la plaque. Ce trait est dû à la précipitation spécifique de la protéine X car il disparaît lorsque l'immunsérum est épuisé par l'extrait trichloracétique.

On voit nettement sur ce diagramme, aux fortes dilutions deux traits de précipitation supplémentaires dans l'extrait trichloracétique et cinq traits dans l'extrait perchlorique.

4) IDENTITÉ IMMUNOLOGIQUE DE LA PROTÉINE X DU SÉROMUCOÏDE α_1 DE SCHULTZE ET LA FRACTION VI-I DE SCHMID.

La méthode de double diffusion en gélose a permis de mettre en évidence l'identité immunologique de la fraction X, du séromucoïde α_1 de SCHULTZE [62] et de la fraction VI-I de SCHMID [60]. Le tableau ci-dessous (tableau IV) résume certaines propriétés physiques et chimiques de ces deux glycoprotéines ainsi que celle de l'orosomucoïde de WINZLER telles qu'on peut les trouver dans la bibliographie.

Des propriétés chimiques et physiques, aussi voisines, permettaient de penser qu'il s'agissait de la même protéine qui portait trois noms différents.

TABLEAU IV.

Propriétés physiques et constitution chimique de l'orosomucoïde de WINZLER, de l' α_1 -glycoprotéine de SCHULTZE et de fraction VI-I de SCHMID.

Propriétés physiques	Orosomucoïde *	α_1 de SCHULTZE	VI-I de SCHMID
Constante de sédimentation ...	3,11	3,5	3,5
Poids moléculaire.....	44,100	44,100	
Mobilité électrophorétique à pH 8,6	$5,1 \times 10^{-5}$ cm ² /volt sec.	$5,1 \times 10^{-5}$ cm ² /volt sec.	
Pt. isoélectrique	1,8 - 2,7	2,9	2,7
<i>Caractères de précipitabilité</i>			
82-96 % de saturation en SO ₄ Am ₂	+	+	+
Acide trichloracétique 10 % ...	—	—	—
Acide perchlorique 0,6 m	—	—	—
Acide sulfosalicylique 10 % ...	—	—	—
Acétate d'Urane.....	+	+	+
Eau bouillante.....	—	—	—
<i>Constitution chimique</i>			
N total en %	10,1 %	10,1 %	10,7 %
Hexoses.....	16,4 %	17,0 %	17,2 %
Hexosamines.....	11,9 %	11,5 %	11,5 %

(*) Orosomucoïde de WINZLER selon les données de l'auteur [90].

L'identité immunologique de ces 2 glycoprotéines et de la fraction X contenue à la fois dans l'extrait trichloracétique et perchlorique est mise en évidence dans la plaque d'OUCHTERLONY suivante (fig. 6). Chaque réservoir est rempli de 50 microgrammes de chacune des trois

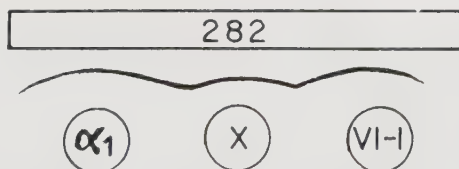


FIG. 6. — Diffusion double en gélose montrant l'identité immuno-chimique de la protéine X, du séromucoïde acide α_1 de SCHULTZE (α_1) et de la fraction VI-I de SCHMID.

fractions à étudier et le canal de 0,3 ml d'immunsérum 282. Il se forme un trait continu de précipitation entre ces trois protéines ce qui prouve leur identité immunologique. WINZLER a nommé orosomucoïde le composant le plus important des protéines perchlorosolubles.

Cet orosomucoïde peut, dans les conditions présentes, être assimilé à la fraction X. C'est la protéine la plus stable et la plus acide du sérum sanguin et ce caractère justifie la dénomination de « séromucoïde acide » que nous proposons de lui donner, en supprimant le qualificatif de « α_1 » qui ne correspond pas à sa mobilité dans le sérum humain.

Avec B. et L. ROBERT [58] nous avons pu montrer que, si le séromucoïde acide et l' α_1 séromucoïde de SCHULTZE sont semblables immunochimiquement, ils ne le sont pas nécessairement chimiquement. Le tableau V montre les résultats des dosages d'azote, d'hexoses et d'acide sialique, de préparations de séromucoïde acide obtenu par précipitation de sept échantillons d'un même sérum humain par l'acide trichloracétique (E.T.) et de l' α_1 séromucoïde de SCHULTZE (Sm A).

TABLEAU V.

Teneur en azote en mg/ml, en hexoses et en acide sialique calculés par rapport à l'azote de 7 extraits trichloracétiques (E.T.) et du séromucoïde acide α_1 de SCHULTZE (Sm A).

Azote mg/ml		Hexoses mg/mg N	Acide sialique mg/mg N	
E.T. 1	0,225 *	3,60 **	0,38	} moyenne 0,383 } écart type 0,080
2	0,225	1,14	0,27	
3	0,225	1,16	0,35	
4	0,225	—	0,38	
5	0,196	—	0,49	
6	0,169	—	0,31	
7	0,225	1,15	0,50	
Sm A	1,022	1,30	0,9	

(*) La moyenne et l'écart type n'ont pas été calculés car les chiffres obtenus présentent une bonne concordance.

(**) Trois valeurs obtenues sont pratiquement semblables et la quatrième paraît aberrante ; aussi les calculs de l'écart type et de la moyenne n'ont pas de signification.

Le séromucoïde acide préparé par précipitation par l'acide trichloracétique contient moins d'azote et moins d'acide sialique mais plus d'hexoses que le α_1 séromucoïde de SCHULTZE. Il semble que le mode de préparation influe sur la composition chimique du séromucoïde acide mais pas sur les groupements antigéniques de la molécule. Le fait que les variations des teneurs en acide sialique et en hexoses n'influe pas sur la réaction antigène-anticorps tend à prouver que la copule glucidique ne participe pas aux groupements antigéniques de la protéine.

5) MOBILITÉS ÉLECTROPHORÉTIQUES DES DIFFÉRENTES PRÉPARATIONS DU SÉROMUCOÏDE ACIDE.

Les variations dans la mobilité des différentes préparations du séromucoïde acide nous ont incité à faire un calcul de mobilité basé sur la méthode décrite par URIEL [76].

La mobilité électrophorétique en gélose (Ue) d'une protéine s'obtient par addition algébrique de sa mobilité électrophorétique apparente (Ua) avec la mobilité électro-osmotique (Uo). Pour déterminer la valeur du flux électro-osmotique on se sert d'une substance qui est électriquement inerte dans les conditions de l'expérience. Certains polysaccharides comme le levane de poids moléculaire d'environ 150.000 se prêtent bien à ces fins.

Ici les résultats sont exprimés en valeurs relatives de mobilité. Celles-ci sont obtenues en faisant les rapports entre les mobilités des constituants protéiques que l'on veut étudier et celle d'une protéine de référence, la sérumalbumine par exemple.

Le levane est coloré [11] par une solution d'urée-acide chlorhydrique et la position de la tache est enregistrée par densitométrie. L'intersection de la perpendiculaire abaissée du sommet de la courbe d'enregistrement avec la ligne de base donne le point zéro. On additionne la distance du point O au réservoir de départ et du réservoir de départ à la protéine de référence d'une part, (U alb.) et à la protéine étudiée d'autre part (U ser.) et on établit le rapport correspondant U alb/U ser. Si ce rapport est supérieur à 1 c'est que la protéine étudiée a une mobilité en gélose supérieure à celle de l'albumine.

Nous avons donc fait une électrophorèse d'un milligramme de levane en même temps et dans les mêmes conditions qu'un sérum humain normal, un extrait perchlorique, un extrait trichloracétique et le séromucoïde de l'acide α_1 de SCHULTZE. Ces trois dernières préparations avaient une concentration de 2,5 mg/ml. Les taches sont enregistrées à l'aide du photomètre enregistreur de Zeiss et le tableau VI résume les résultats obtenus.

TABLEAU VI.

*Mobilités relatives du séromucoïde de l'extrait perchlorique (E.P.),
de l'extrait trichloracétique (E.T.)
et du séromucoïde α_1 (α_1) de SCHULTZE.*

	Temps d'électrophorèse	
	4 heures	4 heures 30
$\frac{U \text{ E.P.}}{U \text{ Alb.}}$	$\frac{5,65}{6,65} = 0,82$	$\frac{7,85}{9,20} = 0,85$
$\frac{U \text{ E.T.}}{U \text{ Alb.}}$	$\frac{6,85}{6,65} = 1,03$	$\frac{9,65}{9,20} = 1,05$
$\frac{U \alpha_1}{U \text{ Alb.}}$	$\frac{6,95}{6,65} = 1,05$	$\frac{9,65}{9,20} = 1,05$

Nous voyons d'après les résultats ci-joints que l'E.T. et l' α_1 de SCHULTZE ont une mobilité légèrement supérieure à l'albumine, alors

que le même séromucoïde préparé par précipitation à l'acide perchlorique a une mobilité inférieure et qui se rapproche de celles des α_1 -globulines.

Le mode de préparation a une très grande influence sur la mobilité de cette protéine. Dans une dernière expérience, le surnageant a été neutralisé immédiatement après la séparation du précipité des protéines du sérum par l'acide perchlorique ; dans ce cas le séromucoïde acide a la même vitesse de migration, en électrophorèse simple que dans le sérum, et dans l'extrait trichloracétique.

Nous avons repris, après un séjour de 2 mois à 4°C, certains de ces extraits perchloriques dans lesquels le séromucoïde acide présentait une mobilité inférieure à celle de la sérumalbumine humaine. L'analyse immunoélectrophorétique (fig. 7) a montré que la mobilité du

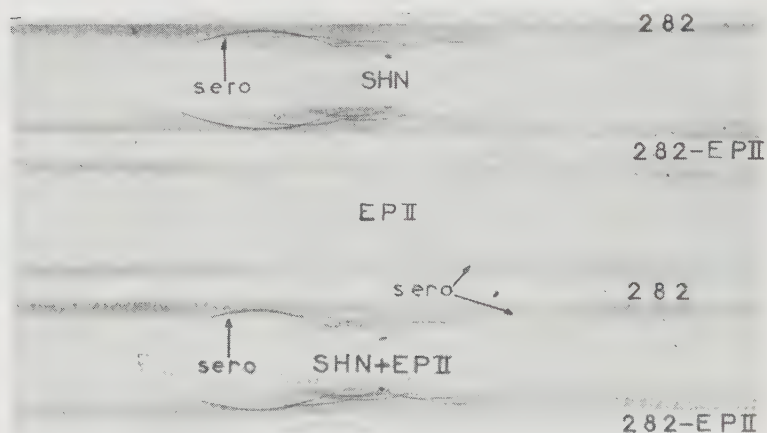


FIG. 7. — Immunoélectrophorèse du sérum humain normal (SHN) et du séromucoïde acide (E.P.) après hydrolyse de l'acide sialique. On observe un changement de la mobilité du séromucoïde acide : il migre en position β_2 .

séromucoïde acide s'était encore ralentie puisque cette protéine (EP II) occupait maintenant une position intermédiaire entre les β_1 et les β_2 -globulines. La ligne de précipitation est bien due au séromucoïde acide puisqu'elle disparaît lorsqu'on emploie un immunosérum épuisé par cette protéine. Le ralentissement du séromucoïde acide est dû vraisemblablement à l'hydrolyse de l'acide sialique car il a été impossible de doser l'acide sialique dans ces cas.

Discussion.

WINZLER [89] le premier a étudié en électrophorèse les filtrats de défécation du sérum sanguin par l'acide perchlorique ; WEIMER et QUINN [84] ont déterminé la molarité pour laquelle le rapport hexoses sur protéines était le plus élevé dans le surnageant de précipita-

tion. Ils ont montré que, lorsque la concentration finale de l'acide perchlorique est de 0,6 M, le rapport hexoses sur protéines est de 20,8 pour un total de 72 mg de protéines et de 15 mg d'hexoses ceci pour 100 ml de sérum humain. La quantité d'hexoses et de protéines solubles augmente pour des molarités inférieures ou supérieures à 0,6 M mais le rapport hexoses/protéines diminue dans les deux cas. Les mêmes conditions ont été adoptées dans ce travail sur les protéines perchlorosolubles mais en supprimant la précipitation par l'acide phosphotungstique et en la remplaçant par une évaporation sous vide pour éviter tout risque de pertes.

L'emploi de l'acide perchlorique qui est un acide fort présente quelques inconvénients car il hydrolyse facilement les hexoses et l'acide sialique présent dans le séromucoïde acide. C'est pour cette raison que nous nous sommes efforcé de standardiser la méthode maximum et à partir de ce moment-là nous avons obtenu des résultats très reproductibles. Les principales précautions à prendre sont 1) de travailler toujours à froid, toutes les opérations ont été faites à 4° 2) de raccourcir au maximum le temps de contact des protéines du surnageant avec l'acide, nous n'avons jamais dépassé 30 minutes entre le début de la précipitation et la fin de la neutralisation et 3) surtout de neutraliser le surnageant avant de le mettre en dialyse. Dans nos premières expériences nous ne l'avions pas fait et c'est à ce moment que nous avons observé des variations importantes dans la mobilité du séromucoïde acide.

**b) Identification de certains constituants antigéniques
dans les extraits perchloriques des sérums humains
normaux et pathologiques.**

WINZLER avait remarqué que les filtrats de déprotéinisation des sérums sanguins contenaient, après concentration, trois composants chargés négativement et migrant vers l'anode en électrophorèse libre à pH acide (2,8 - 4,6). Il les a appelés MP_1 , MP_2 et MP_3 et leurs points isoélectriques sont respectivement de 2,3, 3,4 et 4,3. Après déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique, KALOUS [33] a montré que le filtrat étudié en électrophorèse libre à pH 4,62 contient aussi les trois composants MP_1 , MP_2 et MP_3 .

Nous avons pu montrer (VAUX St CYR et al. [82]) que la fraction MP_1 est composée par trois protéines : le séromucoïde acide, l' α_1 -glycoprotéine et l'albumine. La protéine φ ou protéine riche en tryptophane migre en tampon véronal pH 8,2 en avant de la fraction MP_1 du côté de l'anode. La fraction MP_2 est formée, essentiellement, par l'haptoglobine ; cette dernière protéine est accompagnée de traces d'autres constituants antigéniques qui n'ont pas été encore identifiés. La fraction MP_3 est la β_1 B-globuline ou hémopexine.

LA β_1 B-GLOBULINE OU HÉMOPEXINE.

La β_1 -globuline a été étudiée par nous-même [19] et par BISERTE [2] qui a remarqué sa propriété de fixer les chromoprotéines (hémoglobine, myoglobine et cytochrome C).

La β_1 B-globuline a été identifiée dans les extraits perchloriques de sérums humains tant normaux que pathologiques de la manière suivante : des extraits perchloriques sont préparés à partir de prises aliquotes d'un même sérum humain normal, mais avec la différence suivante : en I, le sérum a été dilué avec 9 volumes d'eau bidistillée et en II avec 9 volumes d'une solution de ClNa à 8,5 pour 1000.

L'immunoélectrophorèse des préparations I et II montrent que EP II contient deux traits de précipitation supplémentaires (fig. 8). Ces deux

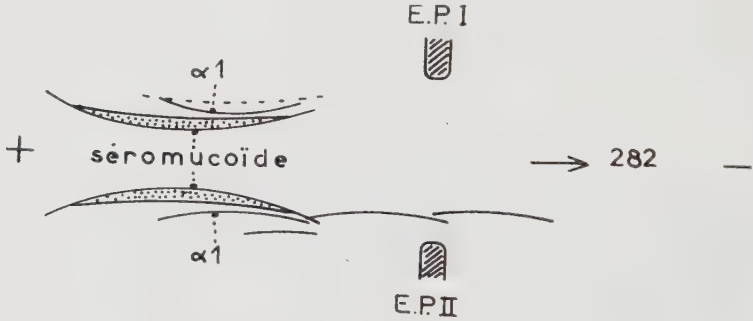


FIG. 8. — Schéma des immunoélectrophorèses des extraits perchloriques EP I et EP II révélés par l'immunsérum 282.

dernières protéines sont des globulines solubles, au moins partiellement, dans l'acide perchlorique 0,6 M en présence de ClNa. Ces fractions ne sont pourtant pas des euglobulines car elles ne disparaissent pas de l'image immuno-électrophorétique d'un sérum humain dialysé contre de l'eau bidistillée.

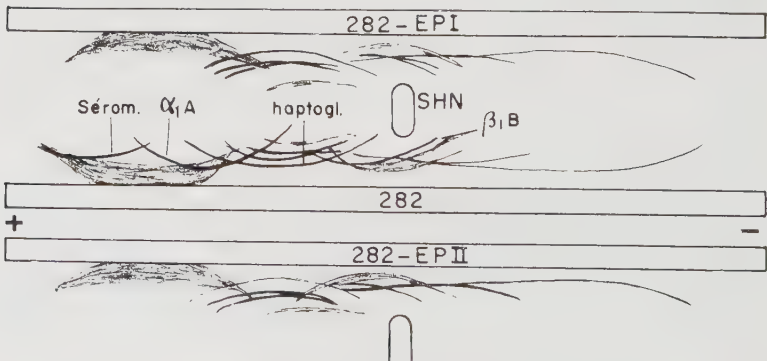


FIG. 9. — Immunoélectrophorèse d'un sérum humain normal (SHN) révélé par l'immunsérum 282 et par le même immunsérum absorbé par les protéines des extraits perchloriques I (EP I) et II (EP II). Avec 282 - EP I, on note la disparition des traits de précipitation du séromucoïde acide et de l' α_1 A glycoprotéine. Avec 282 - EP II, il disparaît en plus ceux de l'haptoglobine et de la β_1 B globuline.

Pour identifier le trait de précipitation supplémentaire dans la préparation II, l'immunsérum de mulet 282 a été absorbé par EP_I et EP_{II} (fig. 9). Dans le premier cas, on voit disparaître de l'image immuno-électrophorétique d'un sérum humain normal révélé par le 282 EP_I essentiellement le séromucoïde acide et l' α_1 A-glycoprotéine. Dans le deuxième cas, lorsque le 282 est absorbé par EP_{II}, il disparaît de l'image immunoélectrophorétique, en plus des deux protéines déjà citées, une des β_1 -globulines. Une ligne de précipitation dans la zone des α_2 -globulines est également très diminuée et elle a été identifiée à l'haptoglobine (voir plus loin).

L'emploi conjugué des immunsérums de mulet 282 et de cheval 1299 a permis d'identifier cette β_1 -globuline à la β_1 B-globuline (fig. 10). En effet, le 282 absorbé par l'EP_{II} montre la disparition d'une β_1 -globuline

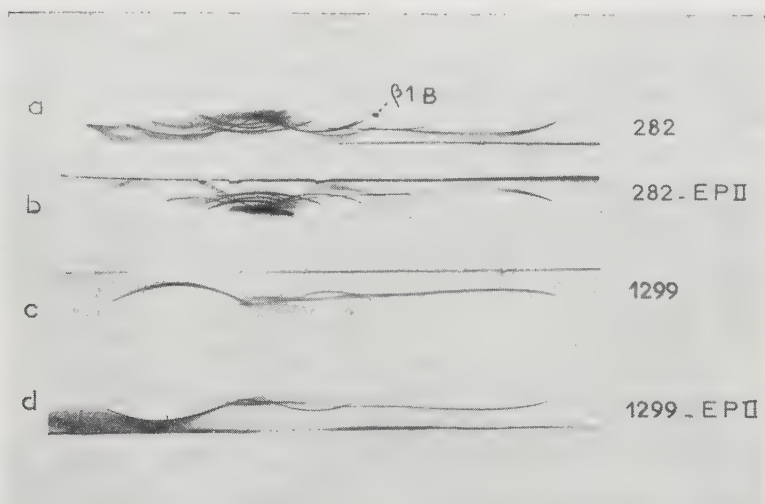


FIG. 10. — Diagrammes immunoélectrophorétiques du sérum humain normal révélé successivement par les immunsérums 282 et 1299 et les mêmes immunsérums absorbés par les protéines de l'extrait perchlorique (EP II). Avec le 282 - EP II, il disparaît le trait de précipitation d'une β_1 globuline, la β_1 B globuline.

autre que la sidérophiline (cette dernière protéine forme toujours l'important arc de précipitation proche de la gouttière des anticorps). D'autre part SELIGMANN [66] a montré que la seule β_1 -globuline révélée par l'immunsérum 1299 est la β_1 A-globuline et celle-ci correspond à une fraction du complément selon MULLER-EBERHARD [44] et PEETOM [49]. Lorsque l'immunsérum 1299 est absorbé par l'EP_{II}, la β_1 A-globuline présente dans le diagramme immuno-électrophorétique du sérum humain normal ne disparaît pas ; donc il s'agit bien de la β_1 B-globuline. Cette β_1 B-globuline se trouve en quantité variable dans les extraits perchloriques de sérums pathologiques humains.

Cette β_1 -B-globuline a la propriété de fixer l'hémoglobine : lorsqu'on ajoute une goutte d'hémoglobine, soit à un sérum frais, soit à un extrait perchlorique de sérum humain, deux traits de précipitation se colorent par la benzidine ; un en α_2 est dû au complexe haptoglobine-hémoglobine (JAYLE et POLONOVSKI [52, 53, 54]) et le deuxième en β_1 est dû à la formation du complexe β_1 B-globuline-hémoglobine (BISERTE [2]) (fig. 11) et GRABAR [19]. NYMAN [46] avait également noté qu'une protéine de mobilité β_1 était capable de fixer l'hème libre de l'hémoglobine alors que le complexe haptoglobine-hémoglobine se ferait par la liaison entre la globine de l'hémoglobine et l'haptoglobine (VAN ROYEN [59]) et LAURELL [36, 37, 38], GRABAR [19] a proposé de nommer cette β_1 B-globuline « hémopexine », ce qui conviendrait bien pour rappeler sa propriété de fixer l'hème des hémoprotéines.

L'HAPTOGLOBINE.

Les extraits perchloriques de sérums humains normaux ou pathologiques dilués par de la solution physiologique montrent un trait important de précipitation en α_2 . Ce trait a été identifié à l'haptoglobine de deux manières différentes :

1) Lorsque l'on ajoute une trace d'hémoglobine à un extrait perchlorique normal ou pathologique et que l'on colore par la benzidine la plaque d'immuno-électrophorèse après lavage et séchage, un trait de précipitation important, dans la zone des α_2 -globulines se colore intensément en bleu. L'activité peroxydasique du complexe est caractéristique de la liaison haptoglobine-hémoglobine (fig. 11).

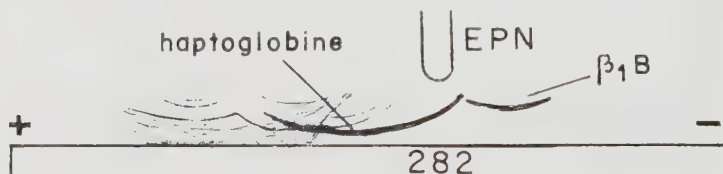


FIG. 11. — La coloration à la benzidine fait apparaître les traits de précipitation de l'haptoglobine et de la β_1 B globuline.

2) L'immunsérum de cheval N° 32 anti-sérum humain normal épuisé par du sérum de cordon ne contient plus que trois anticorps principaux, l'un contre une β_1 -globuline, l'autre contre une α_2 -globuline qui est l'haptoglobine (BURTIN [5]), et le troisième contre une α_1 -globuline qui n'a pas été identifiée. Lorsque l'immunsérum 32 absorbé par le sérum de cordon révèle un extrait perchlorique d'un sérum normal ou pathologique, il se forme toujours un trait de précipitation important dans la zone α_2 , ce qui confirme la présence de l'haptoglobine dans ces extraits (fig. 12).

On peut conclure que l'haptoglobine est présente dans les extraits perchloriques des sérums normaux et pathologiques et que, malgré la précipitation par l'acide perchlorique qui amène le pH de la solution au-dessous de 1, elle n'a perdu ni sa propriété de fixer l'hémoglo-

bine, ni sa mobilité propre. L'haptoglobine est présente en quantités importantes dans les extraits perchloriques des sérums pathologiques, et en particulier dans les cas de cancers bronchiques ou de polyarthrite chronique évolutive.

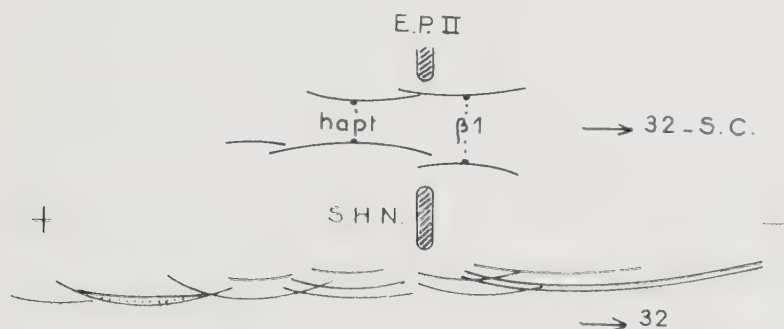


FIG. 12. — Mise en évidence des traits dus à la précipitation de l'haptoglobine et de la $\beta 1 B$ globuline par l'emploi de l'immunsérum 32 absorbé par du sang de cordon (32 - S.C.).

SHN = sérum humain normal.

EPN = extrait perchlorique du même sérum humain.

L' $\alpha_1 A$ -GLYCOPROTÉINE (CONSTANTE DE SÉDIMENTATION : 3,5).

La présence de l' $\alpha_1 A$ -glycoprotéine était connue dans les extraits perchloriques des sérums normaux et pathologiques puisque le trait

282 - EPN

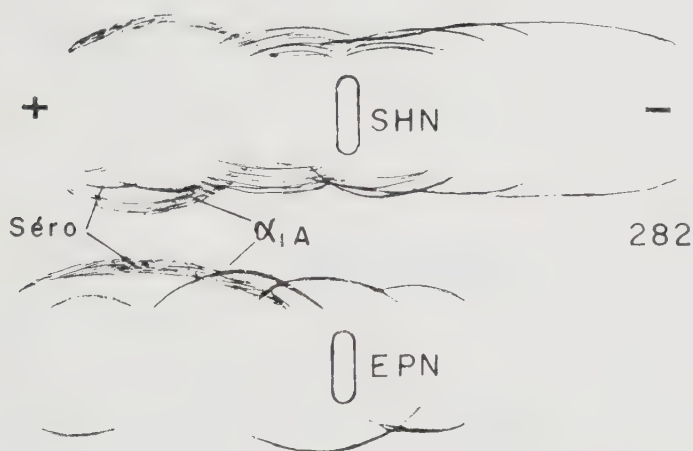


FIG. 13. — Mise en évidence des lignes dues à la précipitation de l' $\alpha_1 A$ glycoprotéine par l'emploi de l'immunsérum 282 incomplètement absorbé par l'extrait perchlorique (282 - EPN).

de précipitation dû à cette protéine disparaissait lorsqu'on révèle un sérum humain par l'immunsérum absorbé par l'extrait perchlorique total. Mais il était difficile de mettre en évidence le trait de précipitation dû à l' α_1 A-glycoprotéine dans le diagramme d'un extrait perchlorique puisque nous ne possédions plus cette protéine à l'état pur pour absorber l'immunsérum. En absorbant partiellement l'immunsérum 282 par un extrait perchlorique riche en fraction MP_3 mais pauvre en MP_2 et MP_1 , et nous servant de cet immunsérum pour révéler un sérum humain normal, et un extrait perchlorique, nous avons pu déterminer le trait dû à la précipitation de l' α_1 A-glycoprotéine (fig. 13). En effet, il ne disparaissait, dans ces conditions, que 2 traits de précipitation dans le diagramme du sérum humain normal : celui du séromucoïde acide et celui de l' α_1 A-glycoprotéine*. De même, il ne disparaissait que 2 lignes de précipitation de l'extrait perchlorique révélé en même temps par le même immunsérum absorbé. Celle du séromucoïde était déjà connue, l'autre est donc celle de l' α_1 A-glycoprotéine. La mobilité de cette protéine est d'ailleurs la même dans le sérum total et dans l'extrait perchlorique.

LA PROTÉINE ρ .

GRABAR [17] a montré, à l'aide de l'analyse immunoélectrophorétique, la présence d'au moins trois protéines migrant plus vite que l'albumine dans le sérum humain normal. L'une a été identifiée au séromucoïde acide [81], l'autre à la lipoprotéine rapide [80], et la troisième à la protéine ρ . SCHULTZE [63] a démontré l'identité immunochimique entre cette protéine ρ et celle qu'il appelle la « protéine riche en tryptophane » ou la « pré-albumine ».

Lorsque l'immunsérum de cheval 32 est utilisé pour révéler les extraits perchloriques de sérum normaux ou pathologiques, il apparaît toujours sur les images un trait supplémentaire de précipitation migrant très rapidement vers l'anode. Ce trait de précipitation a été

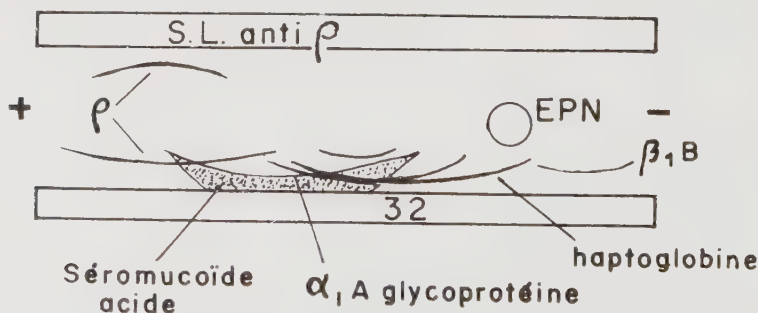


FIG. 14. — Mise en évidence de la protéine ρ dans un extrait perchlorique normal (EPN) à l'aide de l'immunsérum 32 et d'un sérum de lapin spécifique antiprotéine ρ (S.L. anti ρ).

(*) Cette ligne a été identifiée dans le sérum humain grâce à l' α_1 A-glycoprotéine de SCHULTZE de constante de sédimentation 3,5.

identifié à la protéine ζ ou pré-albumine par l'emploi d'un immunsérum de lapin qui, préparé spécifiquement contre la pré-albumine (fig. 14) donne un trait de précipitation net dans cette zone de migration. D'autre part, si on épuise l'immunsérum 32 avec les protéines d'un extrait perchlorique, la ligne de précipitation de la protéine ζ disparaît du diagramme immuno-électrophorétique d'un sérum normal révélé par l'immunsérum ainsi épuisé.

La présence de la protéine ζ a été observée dans un grand nombre de cas pathologiques, elle est toujours augmentée dans les cas de cancers bronchiques et parfois diminuée dans les cas de polyarthrite chronique évolutive. Ni sa mobilité, ni ses propriétés antigéniques ne sont modifiées après l'action de l'acide perchlorique.

L'ALBUMINE.

La présence d'une fraction d'albumine dans les extraits perchloriques a été mise tout d'abord en évidence dans un extrait provenant d'un sérum de malade atteint d'un cancer bronchique. Il était apparu un trait de précipitation supplémentaire et très important dans la zone de migration du séromucoïde acide. Ce trait de précipitation disparaît lorsque l'immunsérum 282 est absorbé par de l'albumine humaine, au point d'équivalence (800 μ g par ml de 282). Dans les premiers extraits à partir de sérums que l'on croyait normaux et qui en fait ne l'étaient pas, jamais le trait de précipitation de l'albumine n'avait pu être mis en évidence. Par contre, lorsque les extraits perchloriques ont été obtenus à partir de sérums de donneurs contrôlés, une faible quantité d'albumine était présente dans le surnageant de défécation par l'acide perchlorique.

TABLEAU VII.

Dosages des protéines et de l'albumine perchlorosolubles.

Diagnostics		Protéines totales mg/ml	Albumine mg/ml
Sérum humain normal	1	8,12	0,22
	2	7,85	0,19
	3	7,63	0,20
Cancer bronchique	1	16,05	0,44
	2 a	12,04	0,44
	2 b	28,5	1,05
	3	11,5	0,48
	4	27,0	1,40
	5	22,7	1,05
	6	12,2	0,61
Cirrhose	7	9,25	0,48
	1	4,8	0
	2	5,15	0
Hémochromatose	1	4,2	0
	2	4,5	0
	3	5,12	0

Le tableau suivant (tableau VII) donne les quantités d'albumine dosée avec la méthode de MAY [40] dans les extraits perchloriques du sérum humain normal et de différents sérums pathologiques (fig. 15).

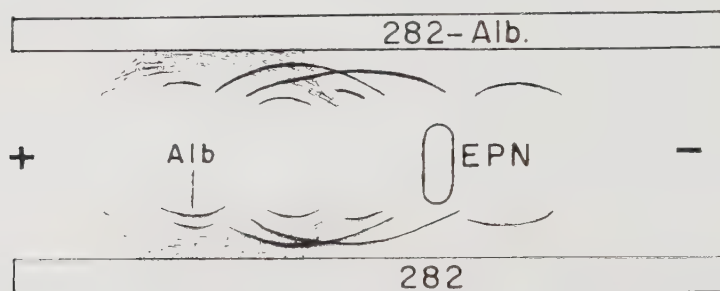


FIG. 15. — Mise en évidence de l'albumine dans l'extrait perchlorique normal (EPN) à l'aide de l'immunsérum total et absorbé par l'albumine.

On remarquera que 1) les sérums normaux contiennent de petites quantités de ce type d'albumine mais qu'il ne semble pas y avoir de rapport très étroit entre la quantité totale de protéines perchlorosolubles et d'albumine dosée ; 2) le taux des protéines totales augmente beaucoup dans les extraits de sérums de malades atteints de cancers bronchiques et que le taux de l'albumine peut atteindre jusqu'à 1 mg 400 par ml d'extrait (ce qui ne représente jamais que 1 mg 400 pour 10 ml de sérum pris au départ). Par contre, dans les quelques cas de cirrhose ou d'hémochromatose étudiés, on voit que l'ensemble des protéines perchlorosolubles est inférieur au taux normal et il n'y a pas du tout d'albumine.

Les expériences suivantes ont été faites pour essayer de voir s'il y avait des différences notables entre cette albumine perchlorosoluble et l'albumine cristallisée.

1°) Dans une plaque d'OUCHTERLONY (fig. 16), nous avons mis dans le réservoir de gauche un extrait perchlorique contenant 1 mg par ml d'albumine perchlorosoluble, dans le réservoir de droite une solution d'albumine humaine à 1 mg par ml et dans le réservoir perpendiculaire un immunsérum de lapin anti-albumine humaine (fraction V de COHN). Il ne se forme qu'un seul trait de précipitation continu entre les 2 fractions d'albumine et l'immunsérum. Ceci prouve que l'albumine perchlorosoluble est identique immunochimiquement à l'albumine, elle possède les mêmes groupements déterminants. D'autre part elle diffuse à la même vitesse que l'albumine extraite du sérum. Les deux traits de précipitation confluent et sont situés à même distance du réservoir des anticorps.

2°) Mais il y a des différences de solubilité très nettes entre ces deux formes d'albumine :

a) il est impossible de la précipiter par de l'acide trichloracétique : plusieurs essais ont été faits pour séparer cette albumine soluble en

précipitant les protéines des extraits perchloriques par un même volume d'acide trichloracétique à 10 %, c'est-à-dire en employant les mêmes conditions que pour déféquer un sérum total. Jamais le moindre précipité ne s'est formé dans ces conditions et pourtant jamais de l'albumine n'a pu être mise en évidence dans le surnageant de précipitation par l'acide trichloracétique de sérums même pathologiques.

b) Il est impossible de la précipiter par relargage au sulfate d'ammonium dans les conditions dans lesquelles on précipite les albumines d'un sérum normal.



FIG. 16. — Mise en évidence de l'identité immuno-chimique de l'albumine (fraction V) et de l'albumine perchlorosoluble.

c) On verra plus loin qu'il ne nous a pas été possible, par chromatographie de la séparer des glycoprotéines, et en particulier, de l' α_1 A-glycoprotéine.

d) Cette fraction d'albumine est soluble dans le chloroforme : pour une série d'expériences que nous décrivons plus tard, une partie d'un même sérum normal a été traitée par le chloroforme avant d'être précipitée par l'acide perchlorique, l'autre partie ayant été employée normalement. Dans les extraits perchloriques du sérum traité par le chloroforme, on ne retrouve pas le trait de précipitation dû à l'albumine. Celui-ci est très nettement visible dans les extraits perchloriques du même sérum employé comme témoin.

3°) Pour voir s'il n'y avait pas tout simplement dissolution ou dégradation d'une certaine partie de l'albumine dans l'acide perchlorique,

1.200 mg d'albumine sont dissous dans 30 ml de solution physiologique (ce qui représente le même taux d'albumine que dans 30 ml de sérum).

a) 10 ml sont précipités par l'acide perchlorique 1,8 M et l'expérience est faite dans les conditions habituelles.

b) 10 ml sont précipités par l'acide perchlorique mais le précipité et le surnageant ne sont pas centrifugés mais laissés à l'étuve à 37° pendant 24 heures.

c) 10 ml sont amenés à pH 4 avec l'acide perchlorique (il n'y a pas de précipitation à ce pH) et laissés également à l'étuve vingt quatre heures.

Les protéines des fractions b et c sont obtenues ensuite par les techniques habituelles. Un dosage au biuret donne les valeurs suivantes : (tableau VIII).

TABLEAU VIII.
Dosage des protéines dans les fractions a, b et c.

Fractions	Nb d'expériences	mg ml
a	3	$\left\{ \begin{array}{l} 1,1 \\ 1,0 \\ 1,0 \end{array} \right.$
b	2	$\left\{ \begin{array}{l} 1,1 \\ 1,2 \end{array} \right.$
c	3	$\left\{ \begin{array}{l} 5,9 \\ 5,8 \\ 5,8 \end{array} \right.$

En électrophorèse simple (fig. 17) on voit en a) une faible tache dans la zone des α_1 , en b) une trainée qui, couvre la zone des α_1 et qui se prolonge au-delà vers l'anode et en c) une faible trainée en α_1 mais une très forte tache dans la zone des β_2 -globulines. A l'analyse immuno-électrophorétique, les 3 fractions révélées par les immunosérums 282 et 32 montrent en a) 2 lignes de précipitation : une forte due à l' α_1 A-glycoprotéine qui accompagne toujours les préparations d'albumine même les plus pures et une très faible due à une deuxième impureté non identifiée. En b), il n'apparaît aucun trait de précipitation, les groupements antigéniques ont été probablement détruits par le séjour prolongé dans l'acide perchlorique à un pH inférieur à 1. En c) les deux traits de précipitation se retrouvent dans la zone des α_1 -globulines mais il n'y a aucun trait de précipitation qui correspond à la tache importante que l'on voit à l'électrophorèse simple dans la zone des β_1 -globulines.

Pour résumer, on peut dire que l'albumine (fraction V de COHN) n'est pas soluble dans l'acide perchlorique, que les groupements antigéniques et probablement la structure chimique de l' α_1 A-glycoprotéine sont détruits par un séjour prolongé dans un milieu où le pH est

inférieur à 1. Par contre, après 24 heures à pH 4 alors que l' α_1 -A-glycoprotéine n'est pas modifiée, une tache importante est visible dans la zone des β_1 -globulines, cette tache est, vraisemblablement, due à l'albumine qui s'est solubilisée en se dégradant puisqu'elle a perdu à la fois sa mobilité propre et ses propriétés antigéniques. Mais le calcul permet de constater qu'il ne s'agit malgré tout que d'une faible fraction 5,9 mg sur 40 milligrammes d'albumine (le reste ayant été précipité ultérieurement par l'acide perchlorique), ce qui représente environ 1,2 %.

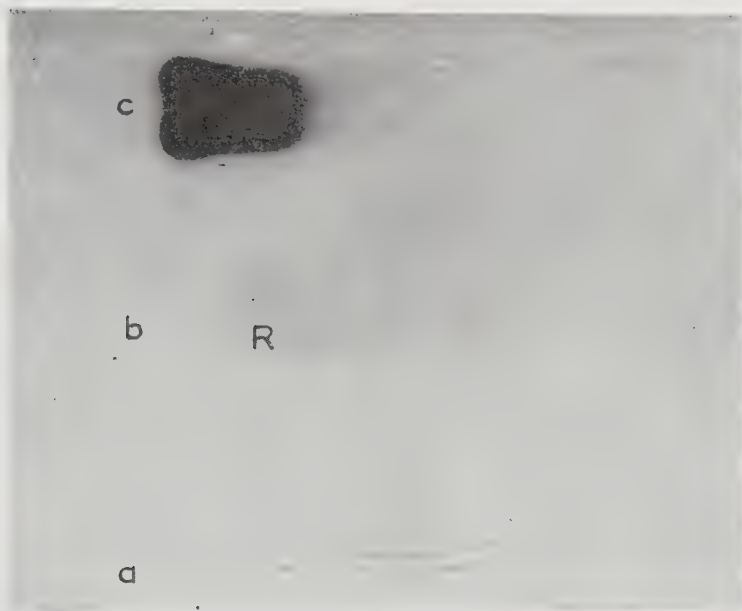


FIG. 17. — Electrophorèse simple et immunoelectrophorèse des trois surnageants a, b et c après précipitation d'une solution d'albumine par l'acide perchlorique.

Donc l'action de l'acide perchlorique sur la sérumalbumine (fraction V) n'explique pas le fait qu'il s'en dissout une certaine quantité lorsqu'on précipite un sérum sanguin par cet acide, ni que la quantité de l'albumine soluble augmente au cours de l'évolution de certains processus néoplasiques comme nous avons pu l'observer plusieurs fois.

Discussion.

L'acide perchlorique utilisé en même temps que l'acide trichloracétique pour isoler et étudier le séromucoïde acide s'est révélé être un solvant intéressant des glycoprotéines du sérum humain. Bien que le

pH du milieu soit inférieur à 1 lorsqu'on précipite les protéines par l'acide perchlorique, les glycoprotéines ne semblent pas être trop modifiées si le temps de contact ne dépasse pas 30 minutes maximum. Elles conservent leurs mobilités propres et même l'activité peroxydase du complexe haptoglobine-hémoglobine a pu être mise en évidence par le réactif à la benzidine. Les perturbations dans les mobilités que nous avons signalées dans les premières publications étaient dues probablement au fait que le temps de séjour dans l'acide était trop long. Il serait intéressant de savoir quel pourcentage de glycoprotéines est entraîné dans le culot par coprécipitation avec les autres protéines ; mais celui-ci ne se redissout jamais d'une manière suffisante pour permettre une analyse immuno-électrophorétique satisfaisante des protéines précipitées.

L'étude des séromucoïdes perchlorosolubles que WINZLER considérait comme une catégorie particulière des glycoprotéines, a permis de mettre en évidence qu'ils étaient formés des principales glycoprotéines du sérum. En effet, on y retrouve essentiellement la β_1 B-globuline, l'haptoglobine, l' α_1 A-glycoprotéine, le séromucoïde acide et la protéine ρ . Les chiffres donnés par WEIMER et QUINN [84] sur le taux de glycoprotéines du sérum sont du même ordre de grandeur que ceux que nous avons obtenus par dosage des protéines perchlorosolubles : ces auteurs parlent de 114 mg environ pour 100 ml de sérum et nous trouvons, en tenant compte des variations individuelles, des valeurs allant de 71 mg à 117 mg pour 100 ml de sérum. Il semble donc que l'on peut parler indifféremment soit de glycoprotéines soit de séromucoïdes en tout cas en ce qui concerne les protéines identifiées d'une manière sûre dans l'extrait perchlorique.

L'analyse immuno-électrophorétique des extraits perchloriques montre qu'il existe dans la zone des α_2 -globulines un certain nombre de traits de précipitation qui n'ont pas été identifiés. On sait d'autre part que la zone des α_2 -globulines dans le sérum est très riche en glycoprotéines, il est possible que celles-ci se dissolvent aussi dans l'acide perchlorique et elles ne pourront être identifiées dans le diagramme du sérum et de l'extrait perchlorique que lorsqu'on aura réussi à séparer et à purifier chacune de ces protéines.

Les expériences faites sur l'albumine (fraction V de COHN) dans les conditions dans lesquelles nous avons étudié l'albumine sérique montre que celle-ci ne se dissout pas dans l'acide perchlorique même lorsqu'on laisse le précipité et le surnageant à 37°C pendant une nuit. Lorsqu'on amène le pH du milieu à 4° — pH auquel CHARLWOOD [8] a étudié le comportement électrophorétique de l'albumine et vu son hétérogénéité entre une forme rapide et la forme normale — la petite quantité d'albumine qui se retrouve en solution ne correspond ni à la forme F ni à la forme N. Elle paraît fortement dégradée : elle a perdu ses groupements antigéniques, car elle ne réagit plus avec les immun-sérums, et sa mobilité car elle migre comme une β_2 -globuline.

Nous avons employé pour doser l'albumine perchlorosoluble la méthode décrite par MAY [40] : celle-ci est basée sur la propriété que possède l'albumine de fixer l'éosine et permet par la suite un dosage

spectrophotométrique car l'éosine fixée est proportionnelle à la quantité d'albumine présente. Cette méthode a été appliquée également au dosage de la sérumbalbumine dans des sérums sanguins [24]. On peut évidemment se demander si l'albumine perchlorosoluble qui n'a pas les mêmes propriétés de solubilité que l'albumine sérique se comporte de la même manière que cette dernière vis-à-vis de l'éosine. Pourtant lorsqu'on compare en boîtes d'OUCHTERLONY des solutions de sérumbalbumine à la même concentration que l'albumine perchlorosoluble dosée par la méthode de MAY, l'allure des traits de précipitation et la vitesse de diffusion en gélose des deux albumines laissent penser que cette technique permet une bonne appréciation des quantités d'albumine soluble dans les extraits perchloriques.

L'albumine perchlorosoluble représente dans les cas normaux une très petite fraction de l'albumine totale environ 100 à 200 μ g, mais cette forme d'albumine augmente dans certains cas pathologiques jusqu'à atteindre 1.200 mg pour la même quantité de sérum. Il est également frappant de voir qu'elle augmente régulièrement au cours de l'aggravation de processus néoplasiques. On sait que l'albumine a la propriété de fixer et de transporter certaines molécules (acides gras, MAY [40] Cu, URIEL [77] sels biliaires et bilirubine) il se pourrait qu'elle fixe les glucides libres qui augmentent au cours de processus néoplasiques et qu'elle se comporte à partir de ce moment là comme une glycoprotéine. Elle fixe peut-être autre chose qui la rendrait soluble. Elle présente d'ailleurs tous les caractères de solubilité des glycoprotéines. Comme nous n'avons jamais réussi à la séparer des autres protéines perchlorosolubles nous n'avons jamais pu vérifier cette hypothèse par dosage des hexoses éventuellement fixés sur cette forme d'albumine.

c) Fractionnement des protéines perchlorosolubles sur diéthylaminoéthyl-cellulose dans différentes conditions.

SOBER et PETERSON [72] ont mis au point une méthode de fractionnement des protéines sériques par adsorption de celles-ci sur celluloses échangeuses d'ions, suivie de désorption avec des solutions de tampons de force ionique croissante et pH décroissant. Cette technique a été utilisée avec les protéines perchlorosolubles pour voir premièrement, si ces dernières se comportaient en chromatographie comme les protéines équivalentes d'un sérum sanguin non traité et deuxièmement si l'on pouvait obtenir un ou plusieurs constituants sous une forme suffisamment pure.

Pour avoir une quantité suffisante et homogène de protéines perchlorosolubles, différents extraits de sérums normaux et pathologiques ont été mélangés, ce qui a donné au total 8 ml d'extrait contenant 17,2 mg de protéines par ml. Ceci a permis de faire deux fractionnements sur une colonne de 2 grammes de diéthylaminoéthyl cellulose avec chaque fois 60 mg de protéines.

A) La première fraction de protéines a été éluée après fixation sur la cellulose par un gradient de tampons formé de 125 ml de tampon

phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$) de molarité 0,01 M et de pH 7 et de 125 ml du même tampon mais de molarité 0,3 M et de pH 5,5 (la molarité est exprimée en ions phosphate). Les protéines éluées sont recueillies par fraction de 5 ml et l'évaluation du taux de protéines dans chaque tube est obtenue par la mesure de la densité optique à 280 m μ au spectrophotomètre.

La courbe d'éluion (fig. 18) montre d'abord deux sommets très petits puis un pic assez élevé : le reste des protéines s'élimine progressivement jusqu'à la fin du gradient. Le liquide effluent est divisé en quatre fractions qui sont dialysées et concentrées avant d'être étudiées en électrophorèse simple et par l'analyse immuno-électrophorétique.

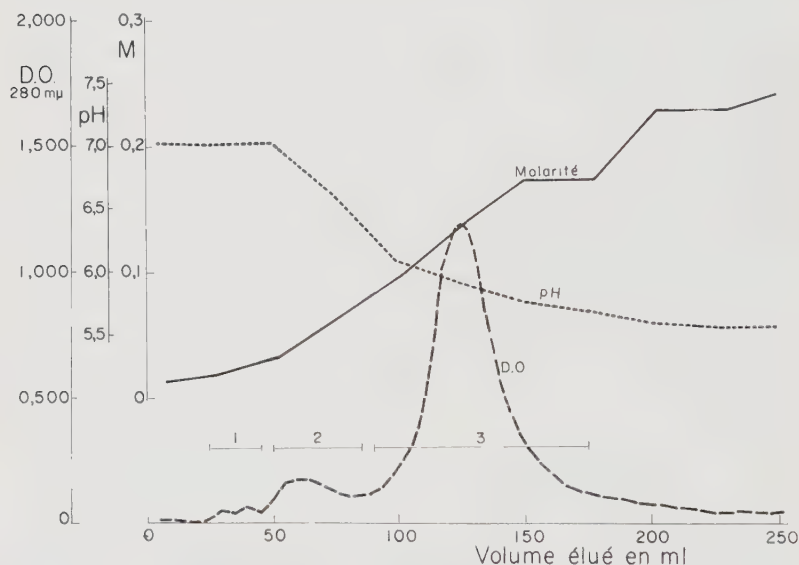


FIG. 18. — Chromatographie sur diéthylaminoéthylcellulose de 60 mg de protéines perchlorosolubles éluées avec un gradient de tampons phosphate - K - K2.

1, 2, 3 : fractions examinées par immunoélectrophorèse.

La fraction 1 est formée par les tubes 5 à 9, la fraction 2 par les tubes 10 à 17, la fraction 3 par les tubes 18 à 35, et la fraction 4 par les tubes 55 à 59.

En électrophorèse simple, seules les fractions 2 et 3 donnent des taches nettes et visibles après coloration par l'amidoschwartz, dans la zone des β_1 -globulines pour la première et dans la zone de l'albumine pour la deuxième. Les fractions 1 et 4 ne présentent que des traînées qui se colorent à peine.

En immuno-électrophorèse, la fraction F₁ révélée par l'immunsérum 282 montre 2 lignes de précipitation dont la première a été identifiée d'une manière sûre à la β_1 B-globuline. Cette fraction contient égale-

ment des traces de γ -globulines probablement dégradées car elles n'ont pu être mises en évidence qu'avec l'immunsérum de lapin anti-protéines urinaires. Cet immunsérum réagit particulièrement bien avec les γ -globulines dégradées.

La fraction F_2 contient l'ensemble des protéines qui migrent normalement dans la zone des β_1 - β_2 -globulines. En épuisant l'immunsérum 282 par F_2 et en se servant de cet immunsérum épuisé pour révéler le sérum humain normal, on a pu montrer que F_2 contient la sidérophiline, la β_2 A-globuline, les β_1 A et β_1 B-globulines et une trace d'une α_2 -globuline non identifiée.

La fraction F_3 contient celles des protéines qui migrent normalement dans la zone comprise entre les α_2 -globulines et les albumines, c'est-à-dire l'haptoglobine, l' α_1 -glycoprotéine, l'albumine et le séromucoïde, plus des traits de précipitation correspondant à des protéines non encore identifiées (la zone des α_2 -globulines est l'une des plus riches mais peu de protéines ont été identifiées encore jusqu'à présent).

La fraction F_4 contient essentiellement la protéine ρ révélée par l'immunsérum 32 à côté de traces d' α_2 et d' α_1 -globulines.

La chromatographie sur cellulose avec un gradient de tampon phosphate ne permet de séparer les protéines perchlorosolubles que par groupes correspondant à leur mobilité en gélose. Par contre, avec un gradient de tampon acétate le séromucoïde acide a pu être isolé d'une manière assez satisfaisante. La deuxième partie de l'extrait perchlori-

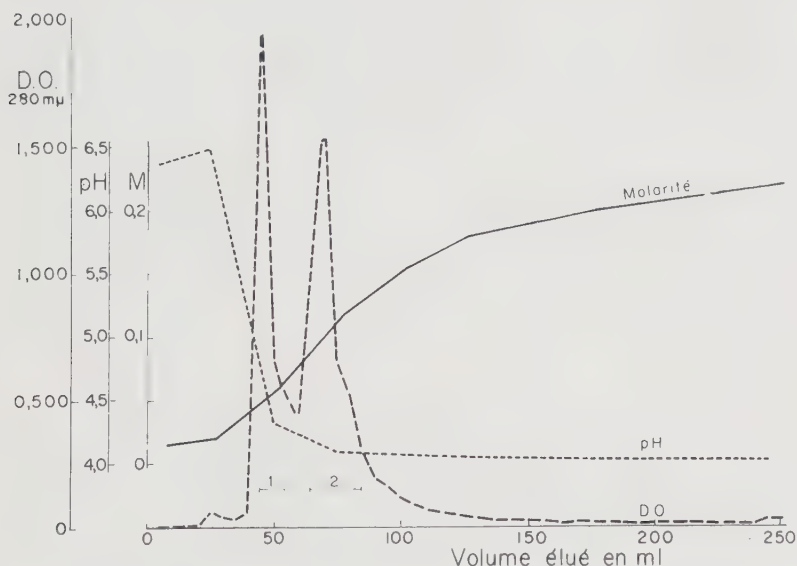


FIG. 19. Chromatographie sur diéthylaminoéthylcellulose de 60 mg de protéines perchlorosolubles éluées avec un gradient de tampons acétate de sodium - acide acétique.

1, 2 : fractions examinées par immunoélectrophorèse.

que comprenant également 60 mg de protéines au total a été éluée de la cellulose DEAE par un gradient de tampon acétate ($\text{CH}_3\text{—COO Na} + \text{CH}_3\text{COOH}$) formé de 125 ml de tampon de molarité 0,01 M et de pH 6 et de 125 ml du même tampon mais de molarité 0,3 M et de pH 4 (la molarité est exprimée en ions Na^+). Les protéines éluées sont recueillies également par fraction de 5 ml et l'évaluation du taux de protéines dans chaque tube est obtenue par la mesure de la densité optique à 280 m μ .

La courbe (fig. 19) a une allure totalement différente de la précédente. On voit seulement deux pics très nets assez élevés et bien séparés l'un de l'autre. A l'électrophorèse simple, ils donnent l'un et l'autre des taches bien visibles après coloration à l'amidoschwartz, le premier dans toute la zone comprise entre le réservoir de départ et l'albumine, le deuxième dans celle du séromucoïde acide et semble n'être formé que d'une seule protéine. En immunoélectrophorèse, la fraction 1 révélée par l'immunsérum 282 montre presque la même image que l'extrait perchlorique total ; on y retrouve toutes les lignes de précipitation sauf celle du séromucoïde acide qui n'existe qu'à l'état de traces. Par contre, la fraction 2 est composée essentiellement du séromucoïde acide à côté des traces de quelques impuretés. Le séromucoïde acide s'élué en tampon acétate d'une manière assez sélective à un pH de 4,3 et une molarité de 0,1 M.

Pour tenter de fractionner l'ensemble des protéines qui forment le premier pic lorsqu'on emploie un tampon acétate, nous avons repris un deuxième mélange d'extraits perchloriques représentant au total 73,15 mg de protéines. Celui-ci a été élué de la cellulose par une série de tampons acétate de molarités croissantes et de pH décroissants. Six tampons différents ont été utilisés (fig. 20), le passage d'un tampon à un autre ne se fait que lorsque la densité optique du liquide effluent tend vers zéro.

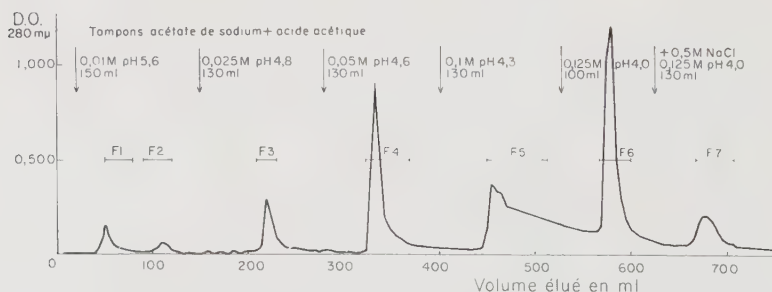


FIG. 20. — Chromatographie sur diéthylaminoéthylcellulose de 73 mg de protéines perchlorosolubles éluées par une série de tampons acétate de sodium - acide acétique.

F₁, F₂ etc. fractions examinées par immunoélectrophorèse.

Avec le premier tampon de molarité 0,01 M et de pH 5,6 il se forme deux petits pics qui, à l'immuno-électrophorèse, donnent le même trait de précipitation qui a été identifié aux γ -globulines.

Avec le tampon suivant de molarité 0,025 M et de pH 4,8 sont éluées la β_2 A-globuline, la β_1 B-globuline, la sidérophiline et des traces d'albumine.

Avec le tampon de molarité 0,05 M et pH 4,6, ce sont l'haptoglobine, l' α_1 A-glycoprotéine, l'albumine et la protéine rho qui sont éluées.

Le séromucoïde acide est élué avec des traces d'un autre constituant antigénique non identifié avec les tampons de molarité 0,1 M pH 4,3 et 0,125 M pH 4,3. Avec le sixième et dernier tampon semblable au cinquième mais auquel est ajouté du chlorure de sodium 0,5 M, on ne voit en immuno-électrophorèse qu'un seul trait de précipitation non identifié.

Discussion.

Pour conclure on remarquera que les protéines perchlorosolubles se comportent sur la cellule DEAE avec un gradient de tampons phosphate comme les protéines du sérum non traité. L'éluion se fait dans le même sens que leur mobilité électrophorétique en gélose. Le premier pic est composé par les γ -globulines, le deuxième par l'ensemble des β_2 et β_1 -globulines et le troisième par les α -globulines et l'albumine. Nous avons obtenu [16] les mêmes résultats avec le sérum humain normal chromatographié dans les mêmes conditions. Avec le tampon acétate par contre, il est possible de fractionner d'une manière assez satisfaisante le séromucoïde acide qui s'élué en deux temps : il passe une première fraction à pH 4,3 et molarité 0,1 M et une deuxième à pH 4 et molarité 0,125 M. SCHMID et BINETTE [61] ont préparé du séromucoïde acide à partir de 248 litres de plasma humain. Ils ont montré que le séromucoïde était hétérogène en électrophorèse en gel d'amidon au point isoélectrique de la molécule (pH 2,7) : il se forme sept bandes. Il retrouvait son homogénéité de part et d'autre du point isoélectrique. Ces auteurs pensent que les variations observées seraient sous le contrôle d'un facteur génétique, mais ceci n'a pas pu être encore entièrement démontré. Les glycoprotéines qui ont été fractionnées ici proviennent d'un mélange de sérums ; il est possible que nous retrouvions le même phénomène moins net puisque le pH employé est 4,3 et 4.

L'ensemble des autres glycoprotéines se fractionne difficilement en tampon acétate.

CHAPITRE IV.

Mise en évidence dans les extraits perchloriques de certains sérums pathologiques de constituants antigéniques absents des extraits perchloriques de sérums normaux.

De nombreux auteurs avaient remarqué une élévation importante des taux des glucides combinés dans les cas de cancer (MIRANDA [42], GREENSPAN [21], RHEES [56]) et dans les cas de rhumatisme articulaire aigu (KELLEY [35] et SHETLAR [69]). WINZLER [89] avait noté une augmentation des séromucoïdes perchlorosolubles ou sulfosalicylicosolubles dans les cas de cancer et de maladies infectieuses. Nous avons pu nous procurer des sérums de malades atteints de cancers bronchiques ou de polyarthrite chronique évolutive ; ils ont été étudiés par l'analyse immunoélectrophorétique pour essayer de mettre en évidence une augmentation « spécifique » de l'une ou de l'autre des protéines perchlorosolubles suivant les cas.

Le taux des protéines perchlorosolubles dosées par la méthode du biuret passe de 8 mg par ml environ dans les cas normaux jusqu'à 28,5 mg par ml dans le cas le plus évolutif. A l'électrophorèse simple après coloration par le noir amide on note un net renforcement des taches dans la zone des α_2 -globulines et de l'albumine. L'analyse immunoélectrophorétique a permis de retrouver dans les extraits de sérums pathologiques les mêmes glycoprotéines que dans les extraits de sérum normaux mais en quantités plus importantes. Ce sont la β_1 B-globuline, l'haptoglobine, l' α_1 A-glycoprotéine, le séromucoïde acide, l'albumine et la protéine ρ . Dans la zone des α_2 -globulines, les traits de précipitation non encore identifiés et qui se trouvaient à l'état de traces dans les extraits perchloriques normaux sont ici plus nombreux et plus épais. Il faut noter qu'il s'agit, certainement, de constituants normaux du sérum sanguin augmentés dans les cas pathologiques sinon ils ne réagiraient pas avec les immunosérums de chevaux préparés par immunisation des animaux avec un mélange de sérums humains normaux. Comme cela a été déjà dit au chapitre III peu de protéines de la zone des α_2 -globulines ont été fractionnées et identifiées ; il est possible que certaines d'entre elles soient des glycoprotéines solubles dans l'acide perchlorique. WINZLER [90] avait constaté par ailleurs que la zone des α_2 -globulines est plus riche en hexoses 5,83 % et immédiatement après, les β_1 -globulines avec 2,65 %. Les protéines perchlorosolubles augmentent sensiblement au cours de l'évolution du processus néoplasique chez un même malade. En six mois le taux des protéines passe de 12,4 mg par ml (E P a) à 28,5 mg

par ml (E P b) et celui de l'albumine de 0,44 mg par ml à 1,050 mg par ml. On peut noter (fig. 21) sur le diagramme immuno-électrophorétique de E P a et E P b : 1) une augmentation importante de tous les traits de précipitation, en particulier de ceux de la zone des α_2 -globulines, 2) l'apparition d'une ligne de précipitation de l'albumine très nette en E P b alors qu'elle n'existe qu'à l'état de trace en E P a et 3) la disparition des traits de précipitation du séromucoïde acide qui s'est redissous en excès d'antigène.

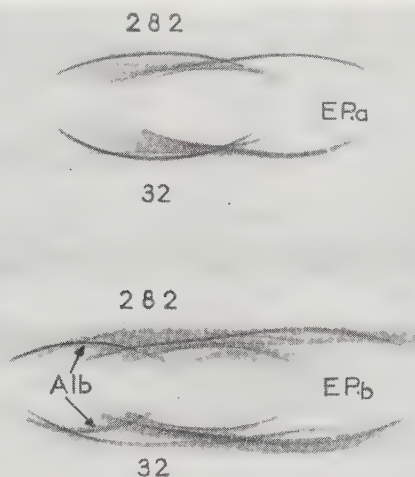


FIG. 21. — Immunoélectrophorèses de deux extraits perchloriques du sérum d'un même malade. Prélèvements faits à 6 mois d'intervalle.

Cette nette augmentation des glycoprotéines est confirmée par l'étude par chromatographie sur DEAE cellulose des surnageants de précipitation par le sulfate d'ammonium à 33 % de saturation, de sérums normaux et pathologiques. Il reste dans le surnageant essentiellement la sidérophiline, une trace de β_1 -globuline, deux α_2 -globulines dont l'une est probablement l'haptoglobine, les α_1 -globulines, l'albumine et le séromucoïde acide. Un volume de sérum humain normal et un volume identique de sérum pathologique (cancer bronchique) sont précipités par le sulfate d'ammonium à 33 % de saturation. Les surnageants sont dialysés contre de l'eau distillée puis contre du tampon phosphate (KH_2PO_4 - K_2HPO_4) 0,005 M pH 5,6 avant d'être fixés sur la cellulose. Pour chaque chromatographie 30 ml du surnageant dialysé sont fixés sur 6 g de DEAE cellulose et élués par un gradient de tampons composé de 250 ml de tampon phosphate 0,005 M pH 5,6 et de 250 ml de tampon phosphate de même pH 5,6 mais 0,3 M. L'allure des 2 courbes est assez différente. La courbe de l'éluution des protéines du sérum normal est composée de 3 pics : le premier pic est formé par la

sidérophiline (fig. 22), le deuxième pic est composé dans sa partie ascendante d'albumine presque pure et dans sa partie descendante d'albumine et des α_2 et α_1 -glycoprotéines. Le troisième pic contient

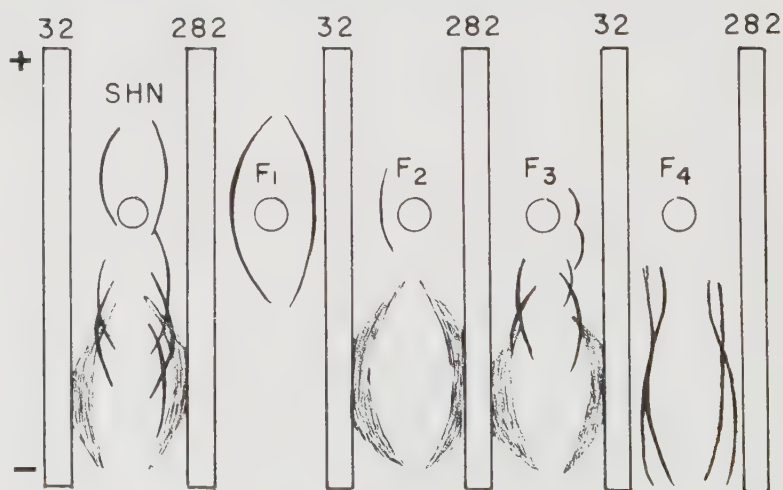
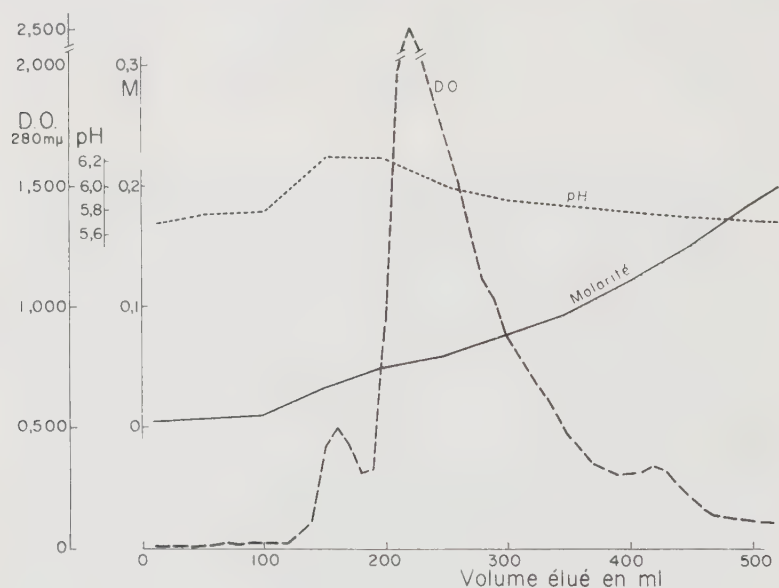


FIG. 22. — 1. Chromatographie sur diéthylaminoéthylcellulose de 30 ml de sérum humain normal (après précipitation par le sulfate d'ammonium au tiers de la saturation).
2. Analyse immunoelectrophorétique des principales fractions,

encore des traces d'albumine et de séromucoïde acide. La courbe de l'éluion du surnageant du sérum pathologique présente 4 pics (fig. 23) le premier pic est dû également à la sidérophiline mais il est conta-

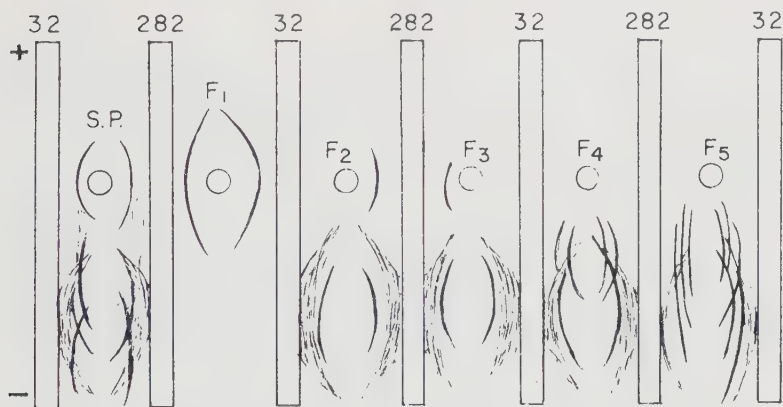
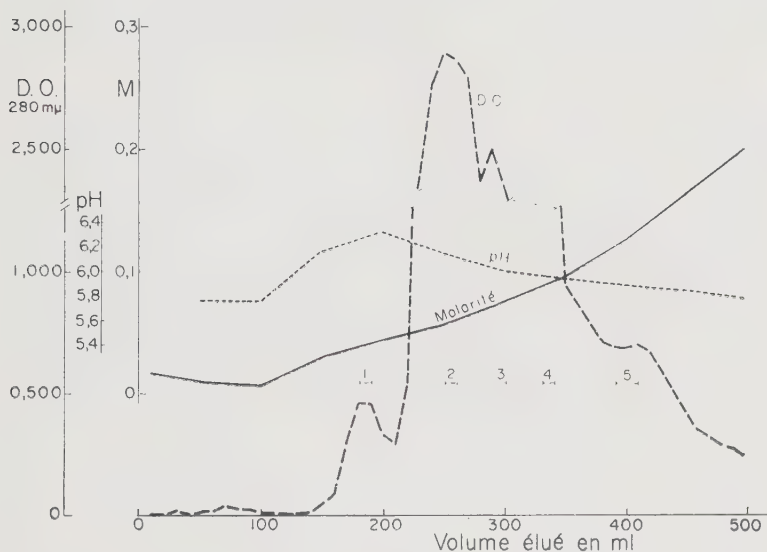


FIG. 23. — 1. Chromatographie sur diéthylaminoéthylcellulose de 30 ml de sérum d'un malade atteint d'un cancer bronchique (après précipitation par le sulfate d'ammonium au tiers de la saturation).
2. Analyse immunoélectrophorétique des principales fractions.

miné par une trace d' α_2 -globuline. La surface occupée par le reste de la courbe est plus importante ici que dans la courbe précédente ; ceci indique que la quantité de protéines éluées est plus grande pour

un même volume de sérum au départ. Le 2^e pic est formé de l'albumine et des traces de sidérophiline et d' α_2 -glycoprotéine, le 3^e est dû essentiellement à l'élution de l' α_1 A-glycoprotéine accompagnée d'albumine. La fraction 4 (ce n'est pas un vrai pic mais une irrégularité de la courbe) est composée d' α_2 -globuline probablement l'haptoglobine, de l' α_1 A-glycoprotéine et d'albumine. Le séromucoïde acide est présent dans le pic 5 avec les mêmes protéines que dans la fraction 4.

Les expériences décrites ci-dessus ont montré qu'il y avait une nette augmentation des séromucoïdes dans les sérums de malades atteints de cancer bronchique ou de polyarthrite chronique évolutive mais qu'il n'y a aucune différence significative entre les protéines perchlorosolubles présentes dans l'un et l'autre cas. Pour essayer de mettre en évidence de faibles modifications nous avons absorbé l'immunsérum de mulet N° 282 par les protéines perchlorosolubles du sérum d'un sujet présentant un cancer bronchique d'une part et d'autre part du sérum d'un malade atteint de polyarthrite chronique évolutive (on ne parlera désormais que de sérum pathologique puisque les résultats sont pratiquement les mêmes dans l'un et l'autre cas). Lorsqu'un sérum humain normal est révélé par cet immunsérum épuisé, il ne reste plus sur le diagramme immuno-électrophorétique qu'un petit nombre de traits de précipitation (fig. 24). Naturellement tous les traits de précipitation correspondant aux glycoprotéines et à l'albumine ont disparu mais il manque également ceux des γ -globulines et de la β_2 A-globuline ; celui de la sidérophiline est très diminué ce qui indique que les anticorps correspondants ont été partiellement épuisés.

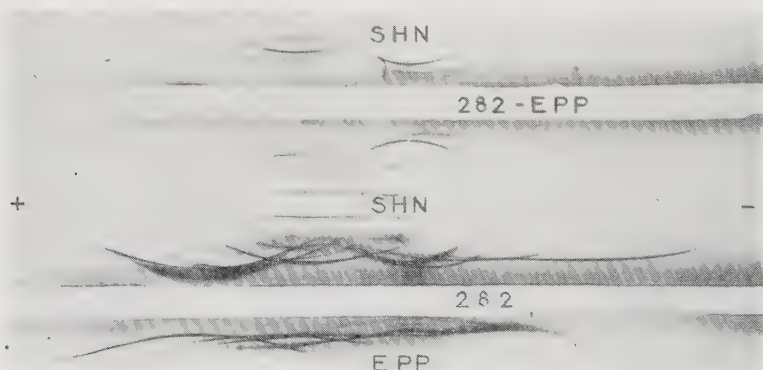


FIG. 24. — Immunoélectrophorèse d'un sérum humain normal (S.H.N.) révélé par l'immunsérum 282 total et absorbé par les protéines perchlorosolubles (EPP) d'un sérum pathologique. On observe la disparition d'un grand nombre de traits de précipitation.

Il a été impossible jusqu'à présent de mettre en évidence le trait de précipitation de la sidérophiline ou de la β_2 A-globuline dans les extraits perchloriques de sérums pathologiques par précipitation directe avec l'un de nos immunsérums antisérum humain normal. C'est seule-

ment par l'emploi d'immunsérum absorbé par l'ensemble des protéines perchlorosolubles pour révéler un sérum normal que l'on voit la disparition ou la diminution très nette du trait de précipitation de ces protéines. On peut envisager qu'elles se trouvent l'une et l'autre soit en trop faibles quantités soit dégradées : elles ne donneraient pas de réaction de précipitation mais l'inhiberaient seulement.

Cas des γ -globulines.

La présence des γ -globulines dans les extraits de sérums pathologiques a été décelée de la même manière et dans les mêmes expériences que pour la β_2 A-globuline : l'immunsérum absorbé par les protéines d'un extrait perchlorique de sérum pathologique ne révèle plus les γ -globulines d'un sérum humain normal, tous les essais pour mettre en évidence ces γ -globulines par précipitation directe avec les différents immunsérums de chevaux anti-sérum humain normal ou avec des sérums de lapins anti- γ -globulines normales n'ont donné que des résultats négatifs. Seul un sérum de lapin (LAUP) préparé avec des protéines urinaires de malades atteints de cancer bronchique a permis de voir le trait de précipitation de ces γ -globulines (fig. 25). La

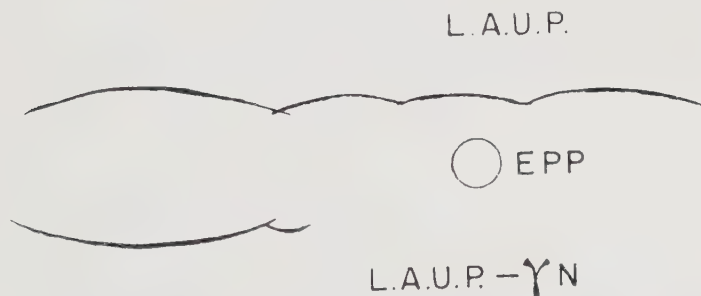


FIG. 25. — Mise en évidence des γ globulines dans les protéines perchlorosolubles d'un sérum pathologique par l'emploi d'un sérum de lapin anti-protéines urinaires (L A U P) total et absorbé par les γ globulines (L A U P) - γ N).

présence dans les extraits perchloriques de sérums pathologiques de constituants qui forment rarement des complexes antigènes-anticorps précipitants mais qui peuvent par absorption de l'immunsérum faire disparaître certains traits de précipitation (γ -globulines et β_2 A-globuline entre autres) d'un diagramme immuno-électrophorétique, peut être interprétée comme étant due à la présence de fragments de la molécule initiale portant certains groupements antigéniques. Ces groupements déterminants seraient suffisants pour absorber les anticorps de l'immunsérum mais les fragments de molécule seraient trop petits pour former le réseau précipitant. Ceci nous a amené à envisager qu'il y a dans les sérums de malades atteints d'affections qui entraînent des destructions tissulaires de diverses origines, des phénomènes de dégradation de protéines par action soit d'un activateur d'enzyme séri-

que soit d'un enzyme protéolytique tissulaire qui agirait au pH sanguin c'est-à-dire aux environs de 7,4. L'enzyme ou l'activateur d'enzyme libéré du tissu passerait dans le sang et attaquerait certaines protéines sériques. Les expériences suivantes ont été faites pour vérifier cette hypothèse.

a) Une certaine quantité de sang est prélevée chez un malade. Le sérum est recueilli le plus vite possible après la rétraction du caillot et filtré sur bougie Chamberland L₃ pour éliminer tout risque de contamination bactérienne puis divisé en deux parties égales. La première moitié est précipitée immédiatement par l'acide perchlorique, suivant la technique habituelle, la deuxième moitié est laissée à l'étuve à 37° pendant plusieurs jours. Après une incubation de trois à cinq jours environ elle est également précipitée par l'acide perchlorique. Le taux des protéines perchlorosolubles est dosé par le réactif du biuret ; nous avons toujours trouvé une élévation nette (tableau IX) des protéines perchlorosolubles après incubation à 37° mais plus ou moins importante suivant les cas. La plus forte augmentation a été observée dans le cas Ma, où l'on passe de 30,8 mg par ml à 44,0 mg par ml.

TABLEAU IX.

Sérums pathologiques (cancer bronchique).

Sérums	Dosage des protéines perchlorosolubles	
	Avant incubation	Après incubation
Va	25,5	34,4
Me	24,4	28,7
Ma	30,8	44,0
Che	22,0	32,0
Cha	14,0	18,2
Ca	9,4	12,5

Des sérums humains normaux provenant de donneurs de l'Institut Pasteur ont été étudiés individuellement et dans les mêmes conditions que les sérums pathologiques. Il s'agissait de voir si, après incubation à l'étuve, on retrouvait également une augmentation des protéines perchlorosolubles. Le tableau suivant donne les résultats obtenus après dosage des protéines par le réactif du biuret.

On peut remarquer que, dans chaque cas, on trouve après incubation une très légère élévation du taux des protéines perchlorosolubles. Celle-ci n'est pas significative prise isolément mais elle se produit chaque fois dans le même sens. Elle se traduit à l'analyse immuno-électrophorétique par l'apparition dans la zone des β_1 -globulines d'un trait de précipitation supplémentaire qui donne une réaction dite d'identité partielle avec celui de l'haptoglobine. Une légère dégrada-

TABLEAU X.
Sérums humains normaux.

Sérums	Dosage des protéines perchlorosolubles	
	Avant incubation	Après incubation
Te	11,7	12,3
Le	9	9,5
Ey	7,1	7,6
Mes	11,5	12
X	9,2	9,9

tion de cette protéine expliquerait peut-être de façon simple l'apparition du trait et la faible augmentation observée dans les cas normaux.

L'étude par l'analyse immuno-électrophorétique des extraits de sérums pathologiques avant et après incubation n'apporte pas beaucoup de renseignements. L'augmentation des protéines solubilisées dans l'acide perchlorique ne se traduit ni par l'apparition de traits de précipitation nouveaux ni par l'épaississement de ceux qui existent déjà. On voit le même dédoublement du trait de précipitation de l'haptoglobine et la quantité d'albumine perchlorosoluble reste la même, elle n'est pas augmentée par l'incubation à 37°.

Discussion.

Les glycoprotéines ou séromucoïdes présentent une fraction des protéines sériques qui ont toujours intéressé les cliniciens car les variations de leur taux dans le sérum sanguin peuvent s'observer au cours d'affections très diverses. BOAS et PETERMAN [3] se sont demandés si les augmentations constatées ne seraient que la traduction d'une réponse systématique de l'organisme à une « agression non spécifique ». Cette étude intéresse également les biochimistes car elle pose le problème de l'origine de ces glycoprotéines et de leur métabolisme.

Un groupe de chercheurs parmi lesquels SEIBERT et COLL [65], CATCHPOLE [7], ENGEL [14], PIRANI et CATCHPOLE [51] pensent que les glycoprotéines seraient des produits de dégradation de la substance fondamentale du tissu conjonctif. Cette « dépolymérisation » se ferait pendant l'évolution du processus entraînant des destructions tissulaires. Pourtant STARY et COLL [73] n'ont jamais trouvé dans le sérum une augmentation du taux de l'acide hexuronique qui forme une partie importante du tissu conjonctif.

POUR SHETLAR et COLL [67, 68] l'augmentation du taux des glycoprotéines sériques est, par contre, le résultat d'une prolifération cellulaire. MUSIL [45] a étudié des cas simples de destruction d'un seul organe suivi de sa régénération comme dans les cas de brûlures graves ou d'hépatites infectieuses. Il montre que le taux des glycoprotéines

augmente plusieurs jours après que l'activité de la transaminase glutamino-oxalacétique a repris sa valeur normale. C'est-à-dire après que le processus de destruction cellulaire a cessé.

Il est assez curieux de noter que dans les cas où le parenchyme hépatique est endommagé (cirrhoses ou hémochromatoses) le taux des séromucoïdes est très faible et l'albumine perchlorosoluble est inexistante. GREENSPAN [22] avait noté des diminutions au cours des affections parenchymateuses du foie (sans complications inflammatoires et en l'absence de métastases néoplasiques) et des augmentations dans les cas d'obstructions biliaires et il y attache beaucoup d'importance pour le diagnostic différentiel des ictères. Ces données impliqueraient peut-être que le tissu hépatique serait le lieu de la synthèse des glycoprotéines comme il l'est pour l'albumine et le fibrinogène. Il semble que l'emploi des anticorps fluorescents selon la technique de COONS [58] sur des coupes de tissus en voie de prolifération pourrait apporter des renseignements importants et permettrait peut-être de déterminer si l'augmentation de certaines glycoprotéines dans le sérum est due à une prolifération ou une nécrose des tissus.

Si le mécanisme de l'augmentation des séromucoïdes dans un certain nombre d'affections est mal connu, la présence de constituants antigéniques normalement insolubles dans l'acide perchlorique ne s'explique pas facilement non plus. Le fait que ces protéines ne réagissent plus avec leurs anticorps homologues pour donner des traits de précipitation, rapproché de leur solubilité dans l'acide perchlorique, permet de penser qu'elles n'existent plus sous leur forme normale et qu'elles auraient été scindées en fragments plus petits que la molécule initiale. Ces fragments, à cause de leur petite taille ou de la nature de leurs groupements terminaux, seraient solubles dans l'acide perchlorique ; ils ont gardé, en outre, suffisamment de groupements déterminants intacts pour inhiber la réaction de précipitation lorsqu'on absorbe les anticorps d'un immunosérum avec des surnageants de défécation de sérums pathologiques.

Le fait de retrouver dans les extraits perchloriques de sérums pathologiques, d'une part, des constituants antigéniques inhibant la précipitation des γ -globulines, de la β_2 A-globuline et de la sidérophiline, d'autre part, une augmentation du taux des protéines solubles après une incubation à l'étuve à 37°C nous a conduit à envisager une dégradation enzymatique de certaines de ces protéines sériques. Cette dégradation pourrait avoir lieu sous l'action, soit d'un enzyme tissulaire, soit d'un activateur d'enzyme sérique, libérés l'un ou l'autre par la nécrose des tissus.

Il n'est pas impossible d'imaginer que les tissus peuvent contenir un enzyme facilement libérable et qui agirait sur les protéines sériques au pH sanguin, c'est-à-dire aux environs de pH 7,4. MARTIN et AXELROD [39] ont mis en évidence dans le tissu cutané un enzyme protéolytique dont l'optimum d'activité serait à pH 7,5 et DANNENBERG et SMITH [10] ont trouvé dans le poumon, le foie et le rein un enzyme protéolytique qu'ils ont nommé la protéinase C et dont l'optimum d'activité serait à pH 8,4. Malgré des expériences répétées et en observant scru-

puleusement les techniques employées par ces auteurs nous n'avons jamais pu extraire cet enzyme. Par contre, ces tissus se sont révélés riches en activateurs, et c'est pour cette raison que la deuxième hypothèse a été envisagée : sous l'action de la nécrose tissulaire il y aurait libération d'activateurs d'enzyme qui agiraient sur le plasminogène sérique et celui-ci activé, attaquerait certaines protéines sériques. ASTRUP et PERMIN [1] ont découvert un activateur tissulaire du plasminogène qu'ils ont nommé la fibrinokinase et ils ont montré que l'action de la fibrinokinase sur le plasminogène serait stoichiométrique et non catalytique. Les tissus les plus riches en fibrinokinase seraient, chez le lapin, le poumon, le rein et le cœur ; le foie et la rate n'ont que très peu d'activité [50].

II^e PARTIE.

CHAPITRE I.

Historique.

Depuis 1838, on sait que le sang coagulé se liquéfie spontanément *in vitro*. MAC FARLANE et BIGGS [33] ont pensé que ce phénomène de lyse était dû à un enzyme protéolytique. Les travaux de CHRISTENSEN [9], KAPLAN [23] et CHRISTENSEN et MACLEOD [13] ont établi que la fibrinolyse pouvait se produire par l'activation d'un zymogène normalement présent dans le sang. Le zymogène a été appelé plasminogène et la plasmine serait l'enzyme résultant de l'activation du plasminogène [4]. L'activation se ferait notamment en présence de streptokinase. KAPLAN [24], TROLL [57], MOUNTER [36] et RONVIN [49] ont montré qu'il s'agirait d'un système différent de celui du trypsinogène-trypsine. En effet [1] leurs zymogènes ne sont pas activés par les mêmes substances, c'est ainsi que la streptokinase n'agit pas sur le trypsinogène, l'enterokinase sur le plasminogène [23] (les kinases sont spécifiques). La caséine préalablement soumise à l'action de la plasmine est encore hydrolysée par la trypsine mais la plasmine est sans effet sur les produits de digestion tryptique de la caséine [13], donc la protéolyse est plus poussée par la trypsine qui hydrolyserait les liaisons peptidiques spécifiques de la plasmine. Les organophosphates et les ions métalliques n'inhibent pas de la même manière ces deux enzymes : il faut des concentrations plus élevées pour inactiver la plasmine [36, 49].

Les études les plus récentes ont porté sur trois points importants : 1°) la purification du plasminogène et de la plasmine afin d'en connaître les principales caractéristiques physiques et chimiques, 2°) les activateurs qui catalysent la transformation du plasminogène en plasmine et 3°) les inhibiteurs qui inhibent soit la formation de la plasmine soit l'activité protéolytique de cet enzyme.

I. PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES.

1) Plasminogène.

a) PROPRIÉTÉS PHYSIQUES.

SCHULMAN et coll. [51] ainsi que DAVIES et ENGLERT [15] ont étudié les propriétés physiques du plasminogène purifié. Celles-ci sont résumées dans le tableau I (d'après DAVIES et ENGLERT).

TABLEAU I.

Propriétés physiques du plasminogène purifié [15].

Constante de sédimentation	4,3 S
Constante de diffusion	$4,31 \times 10^{-7} \text{ cm}^2. \text{ sec}^{-1}$
Volume spécifique partiel	$0,71 \text{ cm}^3. \text{ g}^{-1}$
Viscosité intrinsèque	0,08
Mobilité électrophorétique	à pH 2,9 + $6,6 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1}. \text{ sec}^{-1}$ à pH 4,95 + $2,0 \text{ cm}^2. \text{ V}^{-1} \text{ sec}^{-1}$
Point isoélectrique	pH 5,5 — 6,0
Poids moléculaire	83,800

Cette préparation, examinée à l'ultracentrifugeuse analytique, ne contenait que 5 à 10 % d'impuretés. Par contre, le plasminogène préparé par la méthode de KLINE [27] en contient de 20 à 30 %.

b) PROPRIÉTÉS CHIMIQUES.

Le plasminogène préparé par la méthode de KLINE [27] contient approximativement 1 % d'hexoses, 0,19 % de phosphore et 15,8 % d'azote. Le rapport tyrosine sur tryptophane serait de 1/1,56 [41, 51]. Il est difficile de tenir compte de ces chiffres car les préparations qui ont servi à ces travaux sont contaminées par 20 à 30 % d'impuretés.

2) Plasmine.

a) PROPRIÉTÉS PHYSIQUES.

Le poids moléculaire de la plasmine varie entre 108.000 et 127.000 selon l'activateur utilisé pour catalyser la transformation du plasminogène en plasmine [51]. Si l'on admet que le poids moléculaire de la streptokinase de 50.000 environ, celui du plasminogène purifié [15] de 83.800 et que celui de la plasmine varie entre 108.000 et 127.000, on peut penser que tout se passe comme si la molécule de streptokinase se fixait sur le plasminogène pour former la plasmine. Pourtant ceci est en complet désaccord avec le fait que certains auteurs [4] ont observé la présence de peptides solubles dans l'acide trichloracétique après activation du plasminogène par la streptokinase. Il faut ajouter que tous ces résultats ont été obtenus avec des préparations impures de plasminogène. Ces questions seront probablement résolues à partir du moment où l'on utilisera du plasminogène purifié sur carboxyméthylcellulose [21].

b) PROPRIÉTÉS CHIMIQUES.

La plasmine activée autocatalytiquement dans du glycérol à 50 % [51] contient 1,5 % d'hexoses et 14,1 % d'azote. Le rapport tyrosine sur tryptophane est de 1/1,56, il est donc le même que celui calculé pour le plasminogène.

SOLUBILITÉ DU PLASMINOGÈNE ET DE LA PLASMINE.

Le plasminogène et la plasmine ont les mêmes propriétés de solubilité. Ils sont très solubles au-dessous de pH 5 et au-dessous de pH 9 [37], mais difficilement solubles dans la zone de pH intermédiaires [3]. La lysine augmente la solubilité aux pH neutres.

II. L'ACTIVATION DU PLASMINOGÈNE.

La transformation du plasminogène inactif en plasmine active se fait sous l'action de substances très différentes que nous allons envisager successivement.

A) Activateurs d'origine bactérienne.

a) LA STREPTOKINASE (SK).

TILLET et GARNER [55] ont montré que des filtrats de culture de streptocoques hémolytiques peuvent lyser des caillots de sang en présence d'un facteur extrait du plasma humain [35]. Celui-ci a été identifié au plasminogène [91, 13]. Ce produit bactérien capable de lyser la fibrine a été appelé streptokinase [13]. Purifiée, la streptokinase est un produit homogène qui a un poids moléculaire d'environ 50.000 [17].

Selon TILLET et coll. [54] et GARNER et coll. [19] la streptokinase n'aurait non seulement pas d'activité protéolytique, mais n'attaquerait pas les esters de la lysine et de l'arginine qu'hydrolysent la trypsine (fait connu) et la plasmine [26, 39, 57]. Le seul rôle connu jusqu'à présent de la streptokinase est de catalyser la transformation du plasminogène en plasmine.

TILLET [53] avait noté en faisant une revue d'anciennes publications que les streptokinases provenant de souches de streptocoques hémolytiques de différentes espèces animales semblaient avoir une spécificité très nette. C'est ainsi que la streptokinase utilisée couramment et obtenue à partir d'une souche de streptocoques d'origine humaine, active le plasminogène humain mais pas le plasminogène bovin.

MULLERTZ et LASSEN [38] ont montré que pour activer le plasminogène bovin il fallait ajouter une petite quantité de globulines sériques humaines au mélange streptokinase humaine et plasminogène bovin. Ces auteurs ont schématisé dans les deux équations suivantes le mode d'activation du plasminogène bovin par la streptokinase humaine et les mêmes équations ont été proposées pour l'activation du plasminogène humain [4].

- 1) SKh + Coactivateur h $\rightleftharpoons$ [Activateur du plasminogène bovin].
- 2) Activateur + plasminogène bovin $\longrightarrow$ plasmine

Mais, on n'a jamais pu démontrer d'une manière évidente que plasminogène et coactivateur soient deux entités distinctes ; HAGAN, ABLONDI et DE RENZO [21] pensent que les deux activités sont situées sur la même molécule de plasminogène. De plus, Phyllis ROBERTS [48] pense que plasminogène, activateur et proactivateur sont une seule

et même substance. Ces auteurs ont montré que l'allure de la courbe d'activation du plasminogène par la streptokinase fait penser à un phénomène enzymatique mais celui-ci n'a jamais été démontré.

b) STAPHYLOKINASE.

Le plasminogène est également activé par des filtrats de culture de staphylocoques [20, 29]. Il y aurait une staphylokinase qui n'a pas été purifiée et l'on pense que son action serait enzymatique [32]. Elle n'agirait pas sur les différents plasminogènes de mammifères de la même manière que la streptokinase [14, 32]. En effet la staphylokinase active le plasminogène de l'homme, du chien, du chat et du cobaye mais ni celui du rat ni du bœuf. D'autre part le plasminogène activé soit par la streptokinase soit par la staphylokinase ne lyse pas la fibrine avec la même vitesse.

B) Activateurs d'origine tissulaire ou humorale.

a) FIBRINOKINASE.

ASTRUP et PERMIN [5] ont mis en évidence dans les tissus une substance qui active la transformation du plasminogène en plasmine *in vitro*. Cet activateur a été nommé fibrinokinase par ASTRUP et son action sur le plasminogène supposerait un rapport d'ordre stoichiométrique [5]. Des fibrinokinasés ont été extraites de différents tissus animaux mais n'ont jamais été purifiées.

b) PLASMINE.

CHRISTENSEN [10] pense que le plasminogène se transforme autocatalytiquement en plasmine lorsqu'on extrait par traitement au chloroforme, un inhibiteur qui serait présent dans le sérum. ALKJAERSIG et coll. [3] ont étudié la transformation spontanée du plasminogène en plasmine dans une solution de glycérol à 50 % qui inhibe la destruction du plasminogène et de la plasmine elle-même par cette dernière. Cette réaction est accélérée lorsqu'on ajoute de petites quantités de plasmine, et inhibée par un substrat de la plasmine tel l' γ -N-benzoyl-L-arginine-méthylester (BAME).

c) L'UROKINASE.

L'urokinase est une protéine présente dans l'urine des mammifères qui catalyse la transformation du plasminogène en plasmine [6, 8, 25, 52, 65]. Cette réaction a été étudiée par KJELGAARD et PLOUG [26] en 1957 et par ALKJAERSIG et coll. [4] en 1958. L'urokinase [45], isolée de l'urine humaine par adsorption sur gel de silice, est formée de trois composants principaux à l'électrophorèse. Ces préparations impures d'urokinase hydrolysent la caséine, l' α -N-toluène-sulfonyl-méthylester, l' α -N-benzoyl-L-arginine-méthylester et le L-lysine-éthylester. Elles se comportent donc comme un enzyme protéolytique. MAC FARLANE et PILLING [34] ont montré que l'urine contenait aussi de la plasmine ; il est possible alors que les préparations citées ci-dessus soient contaminées par une petite quantité de cet enzyme ce qui expliquerait

l'hydrolyse de la caséine et des substrats synthétiques. On ne peut donc tirer aucune conclusion de ces expériences.

d) LA TRYPSINE.

L'activation du plasminogène par la trypsine a été étudiée par ALKJAERSIG et coll. [4] ; ils ont montré que cette activation, en présence de 50 % de glycérol est du même ordre que celle due à la plasmine.

III. LES INHIBITEURS.

a) INHIBITEUR DE LA TRANSFORMATION DU PLASMINOGÈNE EN PLASMINES.

L'acide ϵ -aminocaproïque a d'abord été étudié comme un inhibiteur de l'activité protéolytique de la plasmine sur la caséine [7] mais on a vu ensuite qu'il inhibait également l'activation du plasminogène par différents agents tels que la streptokinase.

Le Diisopropylfluorophosphate (D.F.P.) qui est un inhibiteur des estérases carboxyliques aussi bien que de la trypsine et de la chymotrypsine, inhibe la transformation du plasminogène ou la plasmine par la streptokinase. Mais, le plasminogène incubé avec le DFP et dialysé ensuite, est encore activable par la streptokinase [36].

b) INHIBITEURS DE LA PLASMINES.

Le sérum contient un ou plusieurs inhibiteurs de la plasmine [50]. Des expériences semblent prouver que l'activité antiplasmine se trouvait localisée dans la zone des α_1 et α_2 -globulines [22, 42]. NORMAN [42] a montré que l'activité antiplasmine des α_1 -globulines est thermostable, mais que l'inhibiteur présent dans les α_2 -globulines est plus thermostable, et que sa dissociation d'avec la plasmine est indépendante de la température, KLINE et FISHMAN [28] ont montré que l'inhibiteur contenu dans le Soja (S.B.I.) agissait en bloquant l'activité protéolytique de la plasmine mais n'empêchait pas la transformation du plasminogène en plasmine. Ceci serait très important car cela permettrait d'étudier séparément les deux phénomènes. Les organophosphates comme le DFP et les sels de métaux lourds (cuivre, nickel, cobalt, zinc, etc.) inhibent également la plasmine [36].

IV. SUBSTRATS PROTÉIQUES ET SYNTHÉTIQUES DE LA PLASMINES.

La plasmine digère la caséine [1, 10, 11, 41, 46, 47] la gélatine [10], la β -lactoglobuline [12], le fibrinogène et la fibrine [10], et certains facteurs spécifiques du complément [2, 31, 44, 55].

La plasmine hydrolyse également les esters de l'arginine et de la lysine. Ceux-ci ont été souvent employés comme substrats pour étudier l'activité des préparations de plasmine d'origines différentes. Le

pH optimum est de 8,0 pour l'hydrolyse des esters de l'arginine [30, 49] alors qu'il est de 6,5 pour les esters de la lysine [57].

Discussion.

L'ensemble des résultats sur la transformation du plasminogène en plasmine sous l'influence d'activateurs variés est peu satisfaisante pour l'esprit, et la première critique que l'on peut formuler est que la plus grande partie des travaux ont été faits avec des produits incomplètement purifiés. Ceci est vrai pour le plasminogène en particulier, pour les fibrinokinasés et surtout pour l'urokinase qui est mélange de trois composants, au moins, et qui contient probablement de la plasmine. La deuxième critique se rapporte au fait que différents auteurs évoquent un mécanisme enzymatique lors de l'activation du plasminogène par différentes substances sans avoir jamais pu mettre en évidence l'activité enzymatique responsable de cette activation. Ils ont proposé, en plus, pour expliquer cette réaction, des schémas plus ou moins complexes, en faisant intervenir une série d'intermédiaires dont l'existence n'a jamais été démontrée.

On peut cependant tenter de résumer brièvement l'essentiel des données acquises, de la manière suivante : la mesure de l'activation du plasminogène par la streptokinase, la trypsine et la plasmine donne des courbes de même allure permettant de penser qu'il s'agit d'une réaction enzymatique du premier ordre. Et certains faits sont communs à ces différentes formes d'activation.

1) On trouve qu'il y a, dans tous les cas, libération de produits solubles dans l'acide trichloracétique tels que des acides aminés aromatiques à noyaux phénoliques et des glucides d'autre part.

2) L'activation se fait sous l'action d'un enzyme capable d'hydrolyser les esters de la lysine et de l'arginine.

3) Les substrats sont des inhibiteurs compétitifs de l'activation du plasminogène.

C'est pourquoi nous avons repris ce problème et nous avons pu montrer que la streptokinase a une activité estérasique vis-à-vis de l'acétate de β -Naphthyle et nous l'avons étudiée en fonction de différents paramètres. Nous avons pu également montrer que la plasmine est responsable de la dégradation de différentes protéines sériques.

CHAPITRE II.

Matériel et Méthodes.

1) Streptokinase.

La streptokinase que nous avons utilisée provient des Laboratoires Diamant S.A.

2) Le Plasminogène.

a) Un premier échantillon de plasminogène humain nous a été obligeamment fourni par la Croix Rouge Hollandaise. Il ne contenait que des traces d'une impureté, dans la zone de α_2 -globulines (environ 2 %). Puis nous en avons préparé nous-même.

b) PRÉPARATION DU PLASMINOGÈNE HUMAIN.

Un second échantillon de plasminogène humain a été préparé au laboratoire en utilisant la méthode décrite par DERECHIN [16]. Le sérum est ajusté à pH 5,3 avec une solution d'acide acétique 0,5 M puis dilué deux fois et on ajoute le dixième du volume final d'éther. Le précipité formé qui contient le plasminogène et la prothrombine est dissous dans du citrate trisodique (0,049 M), puis amené au volume de départ avec de l'eau distillée. Le précipité formé est redissous dans un tampon acétate-phosphate à pH 4, puis amené à pH 5,15 et dilué trois fois avec de l'eau bidistillée. Le précipité formé est redissous dans un tampon phosphate-NaCl extrait par l'éther. Le surnageant est dialysé 36 heures contre du tampon acétate-phosphate pH 5,15. Il se forme un précipité qui contient du plasminogène, mais qui n'est pas pur comme l'a montré l'analyse immuno-électrophorétique, aussi l'avons nous soumis à une purification ultérieure.

c) PURIFICATION DU PLASMINOGÈNE.

Cette préparation de plasminogène a été purifiée par chromatographie sur carboxyméthylcellulose selon la méthode décrite par HAGAN et coll. [21], avec un gradient formé par 250 ml de tampon formiate 0,1 M pH 2,75 et 250 d'acide chlorhydrique 0,1 M. Le plasminogène élué vers le pH 1,8 ne contient plus que des traces d'impuretés. Mais, son activité protéolytique est assez faible.

d) ACTIVATION DU PLASMINOGÈNE.

Le plasminogène est activé par 100 ou 200 unités de streptokinase ce qui représente approximativement de 200 μ g ou 400 μ g de streptokinase.

3) Mise en évidence et mesure de l'activité protéolytique de la plasmine.

a) APRÈS ÉLECTROPHORÈSE SIMPLE EN GÉLOSE.

L'activité protéolytique du plasminogène activé par la streptokinase est mise en évidence directement après l'électrophorèse en gélose selon la méthode décrite par URIEL [58]. La plaque de gélose, une fois l'électrophorèse terminée, est mise dans un bain contenant le substrat, ici de la caséine à 0,5 %, pendant un quart d'heure. Puis on retire la caséine et on laisse la réaction enzymatique se développer pendant deux à trois heures à l'étuve à 40°C. La plaque est ensuite fixée, séchée et colorée au Noir Amide. Les emplacements possédant une activité protéolytique forment des taches claires ou non colorées (le substrat qui a diffusé dans la gélose est hydrolysé par l'enzyme et les produits de la dégradation enzymatique ne fixent plus le colorant) sur un fond de caséine uniformément colorée par le Noir Amide.

b) MESURE DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE.

1 ml de plasminogène à la concentration voulue (100 µg/ml pour le plasminogène de la Croix Rouge Hollandaise et 5 mg/ml* pour notre préparation) est activé par 200 µg de streptokinase. La caséine est ajoutée pour obtenir une concentration finale de 4 %, et le volume final est amené à 2 ml. Les conditions standard sont : un pH égal à 7,4, une force ionique de 0,2 et la température de 40°C. Le temps d'incubation varie avec le substrat, il est de vingt minutes pour la caséine. L'hydrolyse est arrêtée par addition de 2,5 ml d'acide trichloracétique à 5 % ; le surnageant est obtenu par centrifugation puis filtré. La présence de produits provenant de l'attaque enzymatique est mise en évidence 1°) par la mesure au spectrophotomètre, de peptides à noyaux aromatiques à 280 mµ et par la mesure à 555 mµ des liaisons peptides par la méthode au biuret. Un tube contenant tous les produits sauf la streptokinase, sert de témoin, il est incubé pendant le même temps et précipité de la même manière par l'acide trichloracétique [16]. 2°) Dans le cas de la dégradation des γ-globulines, la réaction est arrêtée par l'inhibiteur du Soja (SBI) et les produits de dégradation sont analysés par l'immuno-électrophorèse.

4) Mise en évidence et dosage de l'activité estérasique de la streptokinase.

a) APRÈS ÉLECTROPHORÈSE SIMPLE EN GÉLOSE.

Les enzymes catalysant l'hydrolyse des esters d'acides carboxyliques sont mis en évidence en utilisant des techniques d'histochimie. La méthode employée ici a été mise au point dans le cas des plaques de gélose par URIEL [59]. Immédiatement après l'électrophorèse, les plaques de gélose sont mises à incuber dans un milieu contenant de l'acétate de β-naphtyle. Le β-naphtol libéré est couplé avec un sel de

(*) Ceci représente 14 Unités caséine par ml.

diazonium, ici l'orthodianisidine diazotée. On a un complexe coloré en rouge-violacé que l'on décèle aisément.

b) MESURE DE L'ACTIVITÉ ESTÉRASIQUE,

1 ml de la solution contenant la streptokinase est mis à incuber à 37°C pendant une demi-heure avec 1,5 ml d'une solution d'acétate de β -naphthyle à 0,02 % dans du tampon phosphate (pH 7,4, 0,05 M). On arrête la réaction par addition de 0,5 ml d'une solution d'acide acétique à 10 % et on mesure au spectrophotomètre à 328 m μ le β -naphthol libéré (URIEL et AVRAMEAS [60]).

CHAPITRE III.

Recherches sur les activités enzymatiques de la Streptokinase et de la Plasmine.

L'augmentation du taux des protéines perchlorosolubles, après incubation à l'étuve à 37°C de certains sérums pathologiques, ne se traduit à l'analyse immuno-électrophorétique ni par l'apparition de traits de précipitation supplémentaires ni par l'épaississement de ceux des glycoprotéines normales solubles dans l'acide perchlorique. Nous pensons que cette augmentation est due, vraisemblablement, à l'apparition dans le filtrat perchlorique de produits de dégradation de certaines protéines sériques, sous l'action d'un enzyme plasmatique activé par des activateurs d'origine tissulaire et n'existant pas dans les sérums normaux.

Cette hypothèse nous a conduit à étudier 1°) le rôle de la plasmine dans l'augmentation des protéines perchlorosolubles puis 2°) les activités enzymatiques de la streptokinase et de la plasmine.

I. Rôle de la plasmine dans l'augmentation des protéines perchlorosolubles du sérum humain normal.

Ce phénomène de dégradation des protéines doit être un phénomène physiologique normal et il a paru intéressant de tenter de le reproduire dans du sérum humain normal ce qui permettrait de se faire une idée plus nette du rôle de la plasmine dans la dégradation de certaines protéines sériques d'une part, et du rôle des activateurs de diverses origines sur l'enzyme lui-même, d'autre part.

Nous avons fait quatre expériences qui sont résumées dans le tableau II en partant chaque fois de 50 ml de sérum provenant de donneurs normaux. Les sérums sont étudiés individuellement après avoir été filtrés sur bougies Chamberland L₃ pour éviter toute contamination bactérienne et ils sont partagés en fractions de 10 ml. La première est précipitée immédiatement par l'acide perchlorique 1,8 M. La deuxième est mise à incuber en même temps que les deux dernières auxquelles on ajoute, en plus, à l'une un activateur et à l'autre un inhibiteur d'enzyme. L'activateur est la streptokinase (SK) à raison de 200 unités pour 10 ml de sérum et l'inhibiteur est le diisopropylfluorophosphate (DFP) à la concentration finale de M⁻³.

On remarque qu'il y a peu de différences entre les colonnes 1 et 2. Par contre l'adjonction de streptokinase montre une augmentation

TABLEAU II.

Evolution de la quantité de protéines perchlorosolubles en fonction d'activateurs et d'inhibiteurs de la plasmine, après incubation à 37°C pendant 5 jours.

SHN	Avant incubation	Après incubation	+ Activateur (SK)	+ Inhibiteur (DFP)
1	9,2 mg/ml	10,1 mg/ml	12 mg/ml	—
2	9,6 »	10,0 »	12,3 »	—
3	9,8 »	9,9 »	15,7 »	9,3 mg/ml
4	8,2 »	8,8 »	10,2 »	8,3 »

significative des protéines perchlorosolubles du sérum humain normal (colonne 3) ce qui tend à confirmer le rôle de la plasmine dans la dégradation des protéines sériques et se traduit par l'apparition de fragments de molécules solubles dans l'acide perchlorique. En présence d'un inhibiteur, il n'y a pas d'activité enzymatique et pas d'augmentation des protéines perchlorosolubles (colonne 4).

CHRISTENSEN [10] a montré en 1946 que lorsque le sérum humain normal est agité pendant 2 minutes avec le dixième de son volume de chloroforme, il se produit en 3 à 4 jours une activation de plasminogène sérique en plasmine. Il attribue cette activation au fait que le chloroforme enlève l'inhibiteur de la plasmine. Nous avons refait les mêmes expériences que précédemment avec du sérum humain normal préalablement traité par le dixième de son volume de chloroforme et nous avons obtenu les résultats exposés dans le tableau suivant (tableau III), résultats qui confirment les données de CHRISTENSEN sur l'activation spontanée de la plasmine dans le sérum.

TABLEAU III.

Evolution de la quantité de protéines perchlorosolubles contenues dans des fractions de 10 ml de sérum humain normal extrait par le chloroforme après 4 à 5 jours d'incubation à 37°C.

SHN + Chl	Avant incubation	Après incubation	+ Activateur (SK)	+ Inhibiteur (DFP)
1	8,9 mg/ml	13,1 mg/ml	15,1 mg/ml	—
2	10,2 »	15,9 »	17,85 »	10,2 mg/ml
3	9,3 »	14,4 »	17,0 »	9,3 »
4	8,2 »	12,9 »	14,9 »	8,3 »

L'on voit que l'augmentation des protéines perchlorosolubles est très nette après une incubation à l'étuve de quatre à cinq jours et elle est encore plus importante lorsque l'on ajoute de la streptokinase. Il semble y avoir une activation supplémentaire de la plasmine sous

l'influence de la streptokinase. Par contre le DFP inhibe totalement la dégradation.

Les extraits perchloriques de toutes ces fractions sériques étudiées par l'analyse immuno-électrophorétique sont semblables les uns aux autres et on ne remarque aucune augmentation des traits de précipitation. Ils sont pourtant différents de l'extrait perchlorique normal car on ne retrouve ni l'albumine perchlorosoluble ni l' α_1 A-glycoprotéine, solubles l'une et l'autre dans le chloroforme. Si l'on absorbe l'immunsérum de mulet 282 par les protéines de la fraction la plus riche (17,85 mg de protéines par ml, celle qui provient de 10 ml de sérum incubés avec de la streptokinase), et que l'on se serve de cet immunsérum pour révéler un sérum humain normal, on voit disparaître les γ -globulines du diagramme immuno-électrophorétique ; les lignes de précipitation de la β_2 A-globuline, de la sidérophiline et même de l'albumine sont nettement diminuées. Nous avons pu reproduire avec un sérum normal le même phénomène que dans certains sérums pathologiques c'est-à-dire une dégradation des protéines sériques sous l'action de la plasmine activée par des activateurs de diverses origines.

II. Activités enzymatiques de la Streptokinase et de la Plasmine.

a) MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTIVITÉ ESTÉRASIQUE DE LA STREPTOKINASE, L'ACÉTATE DE β -NAPHTYLE ÉTANT LE SUBSTRAT.

On admet généralement que le plasminogène n'a ni activité protéolytique ni activité estérasique mais après activation par la streptokinase la plasmine possède les deux activités protéolytique et estérasique [30]. Certains auteurs [21, 48] ont montré que l'allure de la courbe d'activation du plasminogène par la streptokinase fait penser à un phénomène enzymatique. Nous nous sommes demandé si la streptokinase n'était pas l'enzyme responsable de cette activation et nous avons pu montrer qu'elle possède une activité estérasique et qu'elle hydrolyse l'acétate de β -naphtyle. Nous avons ensuite étudié cette activité estérasique en fonction du temps d'incubation, de la quantité de streptokinase et en présence de différents inhibiteurs.

1°) Après électrophorèse en gélose.

Une série d'électrophorèses simples ont été faites dans les conditions habituelles en mettant dans les réservoirs de la streptokinase, du plasminogène et de la plasmine activée par la streptokinase. Une fois l'électrophorèse terminée, les différentes plaques sont colorées par la réaction du complexe acétate de β -naphtyle-orthodiansidine diazotée. Les sites ayant une activité estérasique se colorent en rouge-violet. On peut remarquer sur la figure (1) que la streptokinase possède une forte activité estérasique dans la zone des α_1 -globulines, la plasmine montre dans la même zone une activité estérasique moins prononcée, mais nette. Par contre, le plasminogène ne forme aucun complexe coloré, donc n'a pas d'activité estérasique. L'activité estérasique de la plasmine avait déjà été constatée par LASSEN [30] qui

l'a étudiée sur des substrats tels que l'éthyl ester de la L-benzoylarginine ou sur l'éthylester de la L-lysine, qui sont des substrats spécifiques de l'activité estérasique de la trypsine.

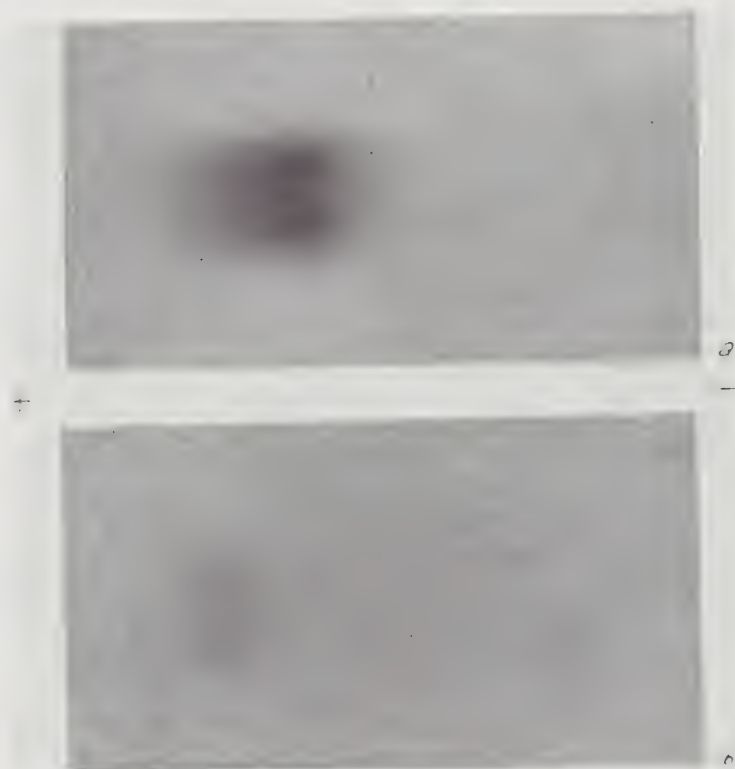


FIG. 1. — Mise en évidence, après électrophorèse en gélose, de l'activité estérasique de la streptokinase (a) et de la plasmine activée par la streptokinase (b).

2°) Mesure de l'activité estérasique de la streptokinase.

L'activité estérasique de la streptokinase est étudiée par l'hydrolyse de l'acétate de β -naphtyle à 37°C au bain-marie. La réaction est arrêtée par l'addition de 0,5 ml d'acide acétique à 10 % et on mesure à 328 m μ l'absorption du β -naphthol libéré.

La première courbe (fig. 2) montre l'activité estérasique de la streptokinase en fonction du temps d'incubation à 37°C. Ici la strepto-

(*) L'activité estérasique de la streptokinase varie assez considérablement d'un flacon à l'autre en fonction des unités, nous avons préféré tout rapporter au milligramme par millilitre.

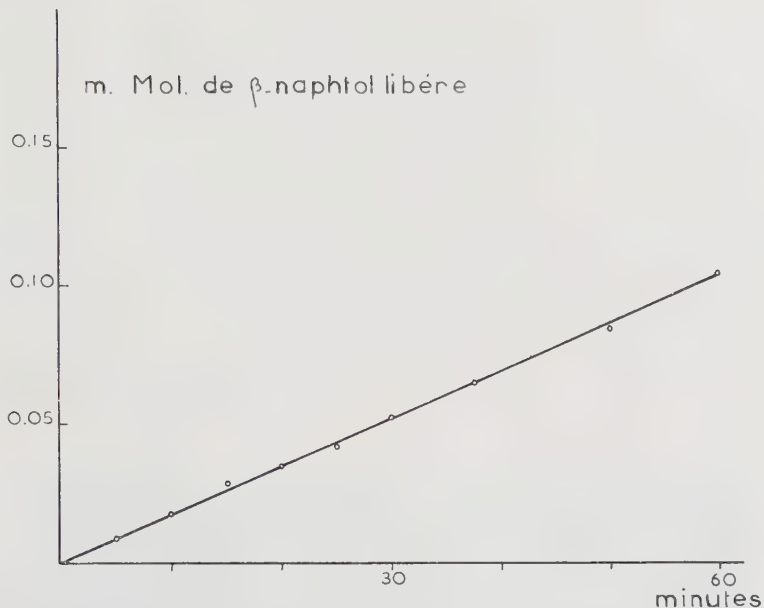


FIG. 2. — Mesure de l'activité estérasique de 1,8 mg de streptokinase en fonction du temps d'incubation à 37°C.

En ordonnée : quantité de β -naphtol libéré en m. Moles (le substrat est l'acétate de β -naphyle).

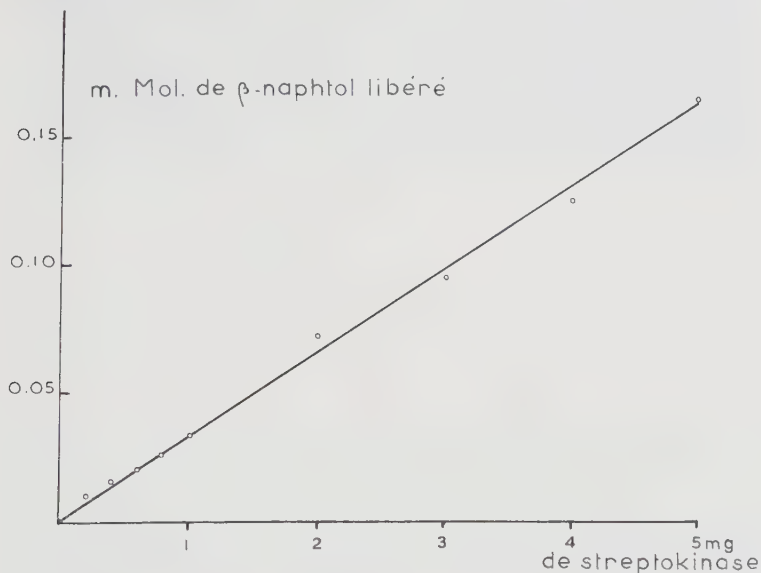


FIG. 3. — Mesure de l'activité estérasique en fonction de la quantité de streptokinase, le substrat étant l'acétate de β -naphyle.

En ordonnée : quantité de β -naphtol libéré en m. Moles.

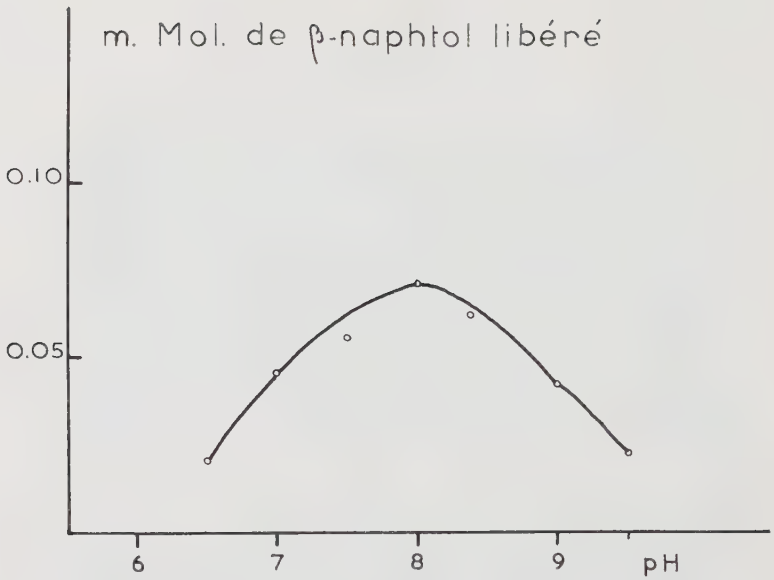


FIG. 4. — Influence du pH sur l'activité estérasique de la streptokinase.

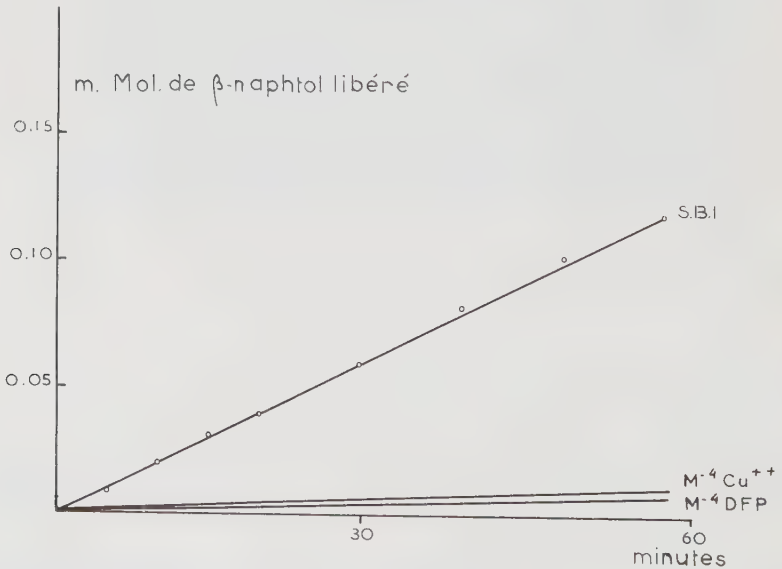


FIG. 4 bis. — Mesure de l'activité estérasique de la streptokinase (2 mg) en présence de différents inhibiteurs : l'inhibiteur du soja (S.B.I.) le diisopropylfluorophosphate (DFP) et l'acétate de cuivre (Cu).

kinase est utilisée à raison de 1,8 mg/ml*. Les mesures sont faites toutes les cinq minutes pendant les trente premières minutes, puis de dix en dix minutes jusqu'à soixante minutes. La réaction donne une droite ce qui prouve que l'on se trouve en présence d'un excès de substrat et l'enzyme est toujours saturé. Le % de substrat transformé en une heure est de 22 %.

La figure suivante (fig. 3) montre la courbe obtenue en fonction de quantités croissantes de streptokinase, la concentration en substrat restant constante, 200 μ g à 5 mg de streptokinase sont incubés pendant trente minutes à 37°C la réaction est stoppée par 0,5 ml d'acide acétique à 10 %, la réaction est également linéaire.

La courbe (fig. 4) montre l'influence du pH sur la vitesse de la réaction. Le pH optimum est de 8, mais nous nous sommes toujours placé à pH 7,4 afin d'être dans des conditions plus voisines des conditions physiologiques normales.

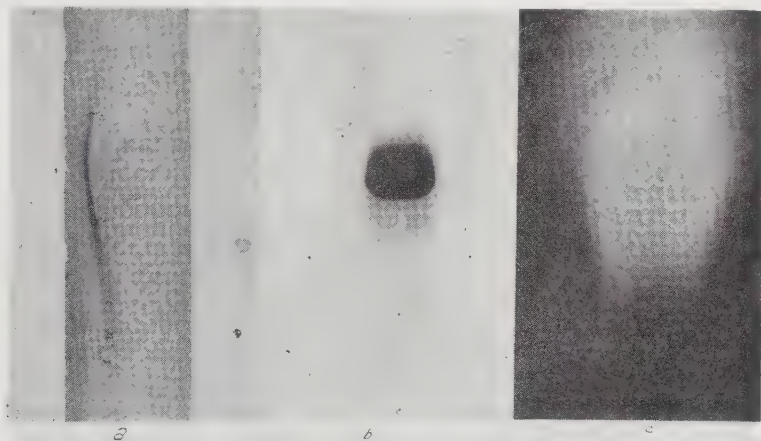


FIG. 5. — Immunoélectrophorèse et électrophorèse simple de la plasmine pure (Croix Rouge hollandaise).

- a) la plasmine ne donne qu'une ligne de précipitation dans la zone des β 1-globulines avec l'immunsérum 282.
- b) coloration au noir Amide.
- c) mise en évidence de l'activité protéolytique de la plasmine le substrat étant la caséine.

Nous avons aussi étudié l'action de différents inhibiteurs. Le diisopropylfluorophosphate (DFP) à la concentration M^{-4} et le cuivre (Cu) à la même concentration inhibent l'hydrolyse de l'acétate de β -naphthyle (fig. 4 bis). Par contre, l'inhibiteur du Soja (SBI) qui est un inhibiteur puissant des enzymes protéolytiques tels que la trypsine ou la chymotrypsine n'a aucune action sur l'activité estérasique de la streptokinase.

b) ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE DE LA PLASMINE.

Le plasminogène pur de la Croix Rouge hollandaise présente à l'analyse immuno-électrophorétique une ligne de précipitation importante dans la zone des β_1 -globulines lorsqu'il est révélé par l'immunsérum 282, antisérum humain total, et la trace d'une faible impureté dans la zone des α_2 -globulines (fig. 5 a). La coloration au Noir Amide ne révèle qu'une seule tache également dans la zone des β_1 -globulines (fig. 5 b). L'emploi de la technique d'URIEL [58] pour l'étude des activités protéolytiques permet de mettre en évidence sur gélose la protéolyse de la caséine par le plasminogène activé par la streptokinase.

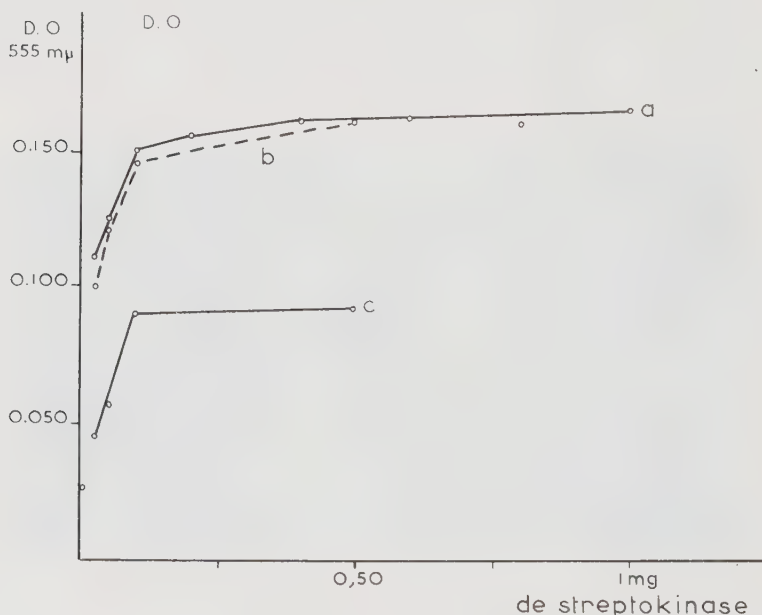


FIG. 6. — Mesure de l'activité protéolytique du plasminogène purifié sur carboxyméthylcellulose activé par des quantités croissantes de streptokinase.

substrat = caséine.

en ordonnée : mesure de l'extinction à 555 mμ due aux liaisons peptidiques libérées.

a - b = 600 μg de plasminogène.

c = 300 μg de plasminogène.

Après l'électrophorèse, la plaque de gélose est incubée dans une solution de caséine à 0,5 % ce qui permet à celle-ci de diffuser dans la gélose. La solution de caséine est retirée au bout d'un quart d'heure et la plaque est laissée en post-incubation pendant trois à quatre heures à 40°C, puis elle est fixée, séchée et colorée, au Noir Amide (fig. 5 c) ;

on voit nettement la zone claire due à la protéolyse de la caséine par la plasmine dans la zone de migration des β_1 -globulines.

La formation de plasmine à partir du plasminogène est mesurée par son activité protéolytique sur la caséine. Elle est proportionnelle à la quantité de streptokinase jusqu'à 100 μg de streptokinase pour 600 μg de plasminogène (fig. 6) et pratiquement indépendante pour des quantités de streptokinase supérieures.

La dégradation des γ -globulines par la plasmine est très difficile à mettre en évidence, car le processus est extrêmement lent, d'une part, et d'autre part les produits de protéolyse des γ -globulines sont peu solubles dans l'acide trichloracétique à 5 % : l'augmentation, soit de l'absorption à 280 $\text{m}\mu$, soit des produits donnant la réaction du biuret n'est pas toujours très significative. Aussi nous avons étudié la dégradation des γ -globulines sériques par l'analyse immuno-électrophorétique avec l'antisérum de cheval 1299 riche en anticorps anti- γ -globulines. Les γ -globulines que nous avons employées proviennent du sérum humain normal et elles ont été purifiées sur colonne de diéthylaminoéthylcellulose (DEAE) : elles sont pures car elles ne donnent qu'un seul trait de précipitation avec les immunosérums de chevaux antisérum humain total.

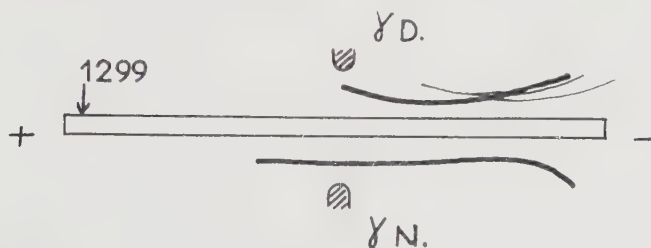


FIG. 7. — Etude par immunoélectrophorèse des γ -globulines dégradées (γ D.) par la plasmine et révélées par l'immunsérum 1299.
N = γ -globulines normales.

La dégradation la plus importante des γ -globulines, a été obtenue de la manière suivante : 1 ml d'une solution de γ -globulines à 0,5 % est incubé vingt quatre heures à 40°C avec 1 ml de solution de streptokinase à 0,5 mg/ml, puis on ajoute 600 μg de plasminogène. Après une nouvelle incubation de vingt-quatre heures, la protéolyse est stoppée par addition de 0,1 ml d'une solution d'inhibiteur du Soja (0,2 %). Le diagramme immuno-électrophorétique montre (fig. 7), d'une part le trait de précipitation des γ -globulines normales (γ N) incubées pendant le même temps sans activateur ni plasminogène, et d'autre part ceux des γ -globulines dégradées (γ D). On remarque ici que le trait principal et le plus important, est raccourci tant du côté anodique que du côté cathodique. Il apparaît, de plus, 2 traits de précipitation supplémentaires dans la zone de migration des γ -globulines lentes. Ces traits de précipitation sont bien dus à la précipitation des γ -globulines puisqu'ils disparaissent lorsque l'immunsérum 1299 est absorbé par des γ -globulines normales.

Discussion.

MAC FARLANE et BRIGGS [33] ont émis l'hypothèse en 1948, qu'un enzyme protéolytique présent dans le sérum sanguin pouvait intervenir dans un certain nombre de processus métaboliques tels que la digestion des dépôts pathologiques de fibrine et l'hydrolyse de protéines sériques. CHRISTENSEN [9] et KAPLAN [23] ont montré que le zymogène ou plasminogène activé, normalement présent dans le sérum sanguin est responsable de la fibrinolyse.

Les résultats que nous avons obtenus en étudiant l'augmentation du taux des protéines perchlorosolubles dans les sérums normaux et pathologiques apportent une confirmation aux hypothèses de MAC FARLANE et BRIGGS. On sait, d'autre part, que les tissus contiennent des quantités variables d'un activateur du plasminogène nommé fibrinokinase. Il est permis de penser que dans les sérums pathologiques, le plasminogène se trouve activé par la fibrinokinase provenant du tissu nécrosé. Il est possible aussi que des enzymes provenant du tissu conjonctif soient présents dans le sérum sanguin et attaquent également les protéines sériques. Lorsque le sérum normal est traité par le chloroforme, il disparaît un inhibiteur de la transformation du plasminogène en plasmine. Le sérum ainsi traité présente après incubation à l'étuve à 37° une augmentation significative du taux des protéines perchlorosolubles. Cette augmentation se traduit comme dans les sérums pathologiques par la présence de fragments de protéines possédant encore suffisamment de groupements antigéniques pour épuiser les anticorps homologues de l'immunsérum. On a surtout observé ce phénomène pour les γ -globulines, la β_2 A-globuline et la sidérophiline.

De nombreux travaux WEBB, ROSE et SEHON [64], FRANKLIN [18], VAUX ST CYR, CLEVE, GOODMAN et GRABAR [61] ont montré que l'urine humaine normale contient environ 70 à 100 mg de protéines par litre, et que les protéines dont le poids moléculaire dépassait 74.000 s'y trouvaient dégradées. Ceci est particulièrement vrai pour les γ -globulines qui se trouvent à l'état de fragments dont les poids moléculaires varient de 16.000 (WEBB [64]) à 35.000 (FRANKLIN [18]). Nous avons étudié (VAUX ST CYR, CLEVE, HERMANN [62]) également des protéines urinaires de malades atteints de cancers bronchiques et nous avons été étonnés de voir que les diagrammes immuno-électrophorétiques de ces protéines étaient très semblables à celles des protéines urinaires normales mais que le taux de protéines excrétées par 24 heures était beaucoup plus élevé puisqu'il pouvait atteindre jusqu'à 400 et 500 mg au lieu de 70 à 100 mg dans les cas normaux. Si dans certains cas pathologiques, on trouve une protéinurie plus abondante, celle-ci pourrait être due à l'accélération du processus de dégradation des protéines sériques par la plasmine activée par des activateurs. Nous espérons pouvoir confirmer dans l'avenir cette hypothèse en comparant les images immuno-électrophorétiques des γ -globulines dégradées *in vitro* par la plasmine à celles des γ -globulines urinaires normales.

Nous n'avons fait qu'aborder ici le problème très complexe de l'activation du plasminogène par la streptokinase et nous avons l'inten-

tion de poursuivre ces recherches dans deux directions et nous voudrions 1°) étudier l'activité estérasique de la streptokinase elle-même afin d'en déterminer les différentes conditions d'action vis-à-vis d'autres substrats synthétiques et calculer si possible la constante de MICHAELIS. 2°) voir si la streptokinase catalyse seulement la transformation du plasminogène en plasmine ou si elle agit également sur le substrat (la caséine ou γ -globuline) pour permettre ensuite la protéolyse par la plasmine.

Des estérases carboxyliques existent en grand nombre dans l'organisme : on en trouve dans le sérum (URIEL [59]) dans les tissus (PAUL et FOTTRELL [43]) et dans les urines (VAUX St CYR, HERMANN et TALAL [63]). D'autre part, des auteurs ont vu que le plasminogène était activé autocatalytiquement dans le sérum lui-même (CHRISTENSEN [10]), par des fibrinokinasés (ASTRUP et PERMIN [5]) et par l'urokinase (KJELGAARD et PLOUG [45]). On peut se demander s'il n'y a pas un rapport très étroit entre ces estérases carboxyliques et les activateurs du plasminogène et il nous semble intéressant d'approfondir ces questions.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Le filtrat de défécation du sérum sanguin par l'acide perchlorique a été étudié par WINZLER qui a montré son hétérogénéité à l'électrophorèse libre à pH acide. En effet il se forme trois fractions MP_1 , MP_2 , MP_3 . Le composant MP_1 contient essentiellement une glycoprotéine acide, l'orosomucoïde. Dans ce travail nous avons identifié différentes glycoprotéines du sérum normal solubles dans l'acide perchlorique. Nous avons vu d'autre part, que l'augmentation du taux des protéines solubles dans les extraits de certains sérums pathologiques était due à deux facteurs différents.

Ce travail met en évidence les faits suivants :

1. La protéine X de GRABAR, l'orosomucoïde de WINZLER, l' α_1 séromucoïde acide de SCHULTZE et la fraction VI-I de SCHMID sont identiques immunochimiquement et les variations que l'on observe dans les dosages des hexoses, de l'acide sialique ou de l'azote proviennent des modes de préparation différents. Le séromucoïde a été identifié à la protéine X de GRABAR et sa place située avec précision dans le diagramme immuno-électrophorétique du sérum humain normal. Les changements de mobilité que l'on observe parfois d'une préparation à l'autre dépendent de la teneur en acide sialique des diverses préparations de séromucoïde acide.

2. Les glycoprotéines qui se solubilisent dans l'acide perchlorique sont principalement la β_1 B-globuline, l'haptoglobine, l' α_1 A-glycoprotéine, le séromucoïde acide et la protéine ρ . L'albumine soluble dans l'acide perchlorique se comporte comme si elle était une glycoprotéine vraie dont il est impossible de la séparer. Toutes ces protéines conservent leur mobilité et leurs propriétés antigéniques intactes si le temps de séjour dans l'acide est très court (trente minutes). Les

complexes hémoglobine-haptoglobine et hémoglobine- β_1 B-globuline conservent leurs activités peroxydasiques.

3. L'augmentation du taux des protéines perchlorosolubles dans certains sérums pathologiques est due pour une part à l'augmentation dans le sérum sanguin des séromucoides et l'origine de ceux-ci serait tissulaire. D'autre part on voit apparaître des constituants antigéniques qui ne sont pas normalement solubles dans l'acide perchlorique tels que les γ -globulines, la β_2 A-globuline, la sidérophiline. Nos expériences viennent à l'appui de l'hypothèse que la plasmine est responsable du clivage des protéines sériques, soit dans les sérums pathologiques, soit dans les sérums normaux après enlèvement par le chloroforme de l'inhibiteur de la plasmine. La dégradation des γ -globulines a été également obtenue *in vitro* par la plasmine activée par la streptokinase.

BIBLIOGRAPHIE.

Première Partie.

1. ASTRUP T. et PERMIN P. M. — *Nature*, 1952, 159, 681.
2. BISERTE G., HAVEZ R., HAYEM A. et LATURAZE J. — *C. R. Ac. Sci.*, 1960, 250, 418.
3. BOAS N. F. et PETERMAN A. F. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1953, 82, 19.
4. BOSTROM H., RODEN L. et YAMASHINA J. — *J. Biol. Chem.*, 1958, 230, 381.
5. BURTIN P. — in « Analyse immunoelectrophorétique — Applications aux liquides biologiques humains » par P. GRABAR et P. BURTIN. Masson et Cie Ed., 1960.
6. BYWATERS H. W. — *Biochem. Z.*, 1909, 15, 322.
7. CATCHPOLE H. R. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1950, 75, 221.
8. CHARLWOOD P. A. — *Biochem. J.*, 1958, 69, 627.
9. COONS A. H. — Fluorescent antibody methods in J. F. Danielli « General cytochemical methods, Vol. 1, p. 399. Academic Press, New-York, 1958.
10. DANNENBERG J. R. et SMITH E. L. — *J. B. C.*, 1955, 215, 45-54.
11. DEDONDER R. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1952, 34, 144.
12. DITTERBRANDT M. — *Am. J. Clin. Path.*, 1948, 18, 439.
13. DOLE V. — *J. Clin. Invest.*, 1944, 23, 708.
14. ENGEL M. B. — *A.M.A. Arch. Pathol.*, 1952, 53, 339.
15. FREUND E. — *Zentr. Physiol.*, 1892, 6, 345.
16. GOODMAN H., VAUX St CYR Ch. de, CLEVE H. et GRABAR P. — « Protides of the Biological Fluids », Proceedings of the 8 th Colloquium, Bruges, 1960, p. 135-137.
17. GRABAR P. — *Arch. Sci. Biol.*, 1955, 39, 589.
18. GRABAR P. et BURTIN P. — Analyse immunoelectrophorétique — Applications aux liquides biologiques humains, Masson Ed., 1960.
19. GRABAR P., VAUX St CYR Ch. de et CLEVE H. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1960, 42, 853.
20. GRABAR P. et WILLIAMS C. W. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1953, 10, 193 et 1955, 17, 67.
21. GREENSPAN E. M. — *Cancer*, 1951, 4, 972.
22. GREENSPAN E. M. — *A.M.A. Arch. Internat. Med.*, 1954, 93, 863.
23. GUINAND S., TONNELAT J., BOUSSIER G. et JAYLE M. F. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, 38, 329.
24. GUYOT M., MAY F. et MAY P. — *Rev. Franc. Et. Clin. Biol.*, 1959, 4, p. 1044-1047.
25. HEWITT L. F. — *Biochem. J.*, 1936, 30, 2229.
26. HEWITT L. F. — *Biochem. J.*, 1937, 31, 360.
27. HIRSCHFELD J. — *Acta Path. Scand.*, 1959, 47, 2104.
28. JAYLE M. F. et BOUSSIER G. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, 36, 959.
29. JAYLE M. F. et BOUSSIER G. — *Expos. Ann. Biochim. Med.*, 1955, 16, 157.
30. JAYLE M. F., BOUSSIER G. et BATIAS M. J. — *Comptes Rend. Soc. Biol.*, 1955, 149, 46.
31. JAYLE M. F., BOUSSIER G. et TONNELAT J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, 38, 343.
32. JAYLE M. F., SERPICELLI J. et ROBERT L. — *Clin. Chim. Acta*, 1956, 1, 452.
33. KALOUS V. — *Chem. Listy*, 1954, 48, 747.
34. KAMINSKI M. — *J. Immunol.*, 1955, 75, n° 5, 367.
35. KELLEY V. C. — *J. Clin. Invest.*, 1950, 29, 1500.
36. LAURELL C. B. et NYMAN M. — « Protides of the Biological Fluids », Proc. of the 5 th Colloquium, Bruges 1957, p. 194 Elsevier Pub. Co. Amsterdam, 1958.
37. LAURELL C. B. et NYMAN M. — *Blood*, 1957, 12, 493.

38. LAURELL C. B. et NOYES W. — « Protides of the Biological Fluids » Proceedings for the 7th Colloquium, Bruges 1959.
39. MARTIN C. J. et AKELROD A. E. — *J.B.C.*, 1957, **224**, 309-321.
40. MAY P. — Thèse, 1959.
41. MEHL J. W., GOLDEN F. et WINZLER R. J. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1949, **72**, 110.
42. MIRANDA F. J. — *Rev. Clin. Espan.*, 1955, **57**, 81.
43. MORISS D. L. — *Science*, 1948, **107**, 254.
44. MULLER-EBERHARD H. J., NILSSON U. et ARONSSON T. — *J. Exp. Med.*, 1960, **111**, 217.
45. MUSIL J. — *Clin. Chim. Acta*, 1961, **6**, n° 4, 508-515.
46. NYMAN M. — VII^e Coll. Hôpital St-Jean, Bruges 1959.
47. ODIN L. — *Acta Chem. Scand.*, 1955, **9**, 714.
48. OUCHTERLONY O. — *Arch. Chem.*, 1948, **21**, B, 14.
49. PEETOM F., VAN DER HART M. et VAN LOGHEM J. J. — Comm. Réunion. Soc. Int. Hématol. Londres, 1959.
50. PERMIN P. M. — *Nature*, 1947, **160**, 571.
51. PIRANI C. L. et CATCHPOLE H. R. — *A.M.A. Arch. Pathol.*, 1951, **51**, 597.
52. POLONOVSKI M. et JAYLE M. F. — *Comptes Rend. Chim. Biol.*, 1938, **129**, 457.
53. POLONOVSKI M. et JAYLE M. F. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1939, **21**, 66.
54. POLONOVSKI M. et JAYLE M. F. — *C. R. Ac. Sci.*, 1940, **211**, 517.
55. POPENOE E. A. et DREW R. M. — *J. Biol. Chem.*, 1957, **228**, 673.
56. RHEES M. C. — *Am. J. Clin. Path.*, 1954, **24**, 774.
57. RIMINGTON C. — *Biochem. J.*, 1940, **34**, 931.
58. ROBERT B., VAUX St Cyr Ch. de, ROBERT L. et GRABAR P. — *Clin. Chim. Acta*, 1959, **4**, n° 6, 828.
59. VAN ROYEN A. H. — Thèse Delft, 1950.
60. SCHMID K. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, **75**, 60.
61. SCHMID K. et DINETTE J. P. — *Nature*, 1961, **190**, n° 4776, 630.
62. SCHULTZE H. E., GOLLNER J., HEIDE K., SCHONENBERGER M. et SCHWICK G. — *Zschrft. Natur for oisch.*, 1955, **10**, 463.
63. SCHULTZE H. E., SCHONENBERGER M. et SCHWICK G. — *Biochem. Ztschr.*, 1956, **328**, 267.
64. SCHULTZE H. E. et SCHWICK G. — *Behringwerk Mitteilungen*, 1957, **33**, 11.
65. SEIBERT F. B., SEIBERT N. V., ATNO A. J. et CAMPBELL H. W. — *J. Clin. Invest.*, 1947, **26**, 90.
66. SELIGMANN M. et HANAU C. — *Revue Hematol.*, 1958, **13**, 239.
67. SHETLAR M. R., FOSTER J. V., SHETLAR C. L. et EVERETT M. R. — *Cancer Research*, 1949, **9**, 515.
68. SHETLAR M. R., KELLY K. H., FOSTER J. V., SHETLAR C. L. et EVERETT M. R. — *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1950, **59**, 1140.
69. SHETLAR M. R. — *Proc. Soc. Exp. Med.*, 1953, **83**, 75.
70. SMITH E. L., BROWN D. M., WEIMER H. E. et WINZLER R. J. — *J. Biol. Chem.*, 1950, **185**, 569.
71. SMITHIES O. — *Biochem. J.*, 1955, **61**, 629.
72. SOBER H. A. et PETERSON E. A. — *Fed. Proc.*, 1958, **17**, 1116.
73. STARY Z. et YUAVANIDIS M. — *Biochem. Z.*, 1953, **324**, 206.
74. STAUB A. M. et RIMINGTON C. — *Biochem. Z.*, 1948, **42**, 5.
75. SVENNERHOLM L. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, **24**, 604.
76. URIEL J. — in « L'Analyse immunoélectrophorétique — Applications aux liquides biologiques humains » par P. GRABAR et P. BURTIN, p. 57-79, Masson et Cie Ed., 1960.
77. URIEL J. — *C. R. Ac. Sci.*, 1960, **250**, 3422-3424.
78. URIEL J. et GRABAR P. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 427.
79. URIEL J. et GRABAR P. — « Protides of Biological Fluids » Proceedings of the 8th Colloquium, Bruges, 1960, p. 195-198.
80. URIEL J. et GRABAR P. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, **38**, 1253-1269.
81. VAUX St Cyr Ch. de, COURCON J. et GRABAR P. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, **40**, 579-590.
82. VAUX St Cyr Ch. de, CLEVE H. et GRABAR P. — *Rev. Franc. Et. Clin. Biol.*, 1960, **5**, n° 8, 776.
83. WEIMER H. E., MEHL J. W. et WINZLER R. J. — *J. Biol. Chem.*, 1950, **185**, 561.

84. WEIMER H. E. et QUINN F. A. — *Clin. Chim. Acta*, 1958, 3, 419.
85. WERNER J. — *Acta Chim. Scand.*, 1951, 5, 1396.
86. WERNER J. et ODIN L. — *Acta Soc. Med. Uppsaliensis*, 1952, 57, 230.
87. WIEME R. J. et RABEAY M. — *Naturwissenschaften*, 1957, 44, 112.
88. WINZLER R. J., DEVOR A. W., MEHL J. W. et SMYTH J. M. — *J. Clin. Invest.*, 1948, 27, 609.
89. WINZLER R. J. et SMYTH J. M. — *J. Clin. Invest.*, 1948, 27, 617.
90. WINZLER R. J. — in « Ciba Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides » (G. E. W. WOLSTEN HOLME and O'CONNOR ed.) p. 245, 1958.
91. WINZLER R. J. — Glycoproteins in « The plasma Proteins » vol. 1, p. 309-341, Acad. Press, 1960, N.Y.
92. WINZLER R. J. — Résultats non publiés.
93. YAMASHINA J. — *Acta Chem. Scand.*, 1956, 10, 1666.
94. ZANETTI C. — *Ann. Chim. farm.*, 1897, 12, 1 et *Gazz. Chim. Ital.*, 1903, 33, 160.

Seconde Partie.

1. ABLONDI F. B. et HAGAN J. J. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1958, 99, 769.
2. ALAGILLE D. et SOULIER J. P. — *Semaine Hôp.*, 1956, 37, 35.
3. ALKJAERSIG N., FLETCHER A. P. et SHERRY S. — *J. Biol. Chem.*, 1958, 233, 81.
4. ALKJAERSIG N., FLETCHER A. P. et SHERRY S. — *J.B.C.*, 1958, 233, 86.
5. ASTRUP T. et PERMIN P. M. — *Nature*, 1947, 159, 681.
6. ASTRUP T. et STERNDORFF J. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1952, 81, 675.
7. British Patent Specification, Her Majesty's Press (England) 770, 693.
8. CELANDER D. R., LANGLINIS R. P. et GUEST M. M. — *A.B.B.*, 1955, 55, 286.
9. CHRISTENSEN L. R. — *J. Gen. Physiol.*, 1945, 28, 363.
10. CHRISTENSEN L. R. — *J. Gen. Physiol.*, 1946, 30, 149.
11. CHRISTENSEN L. R. — *A.B.B.*, 1954, 52, 128.
12. CHRISTENSEN L. R. — in « Streptococcal infections » Columbia Univ. Press. N.Y., 1954.
13. CHRISTENSEN L. R. et MAC LEOD C. M. — *J. Gen. Physiol.*, 1945, 28, 559.
14. CLIFFTON E. et CANNAMELA D. — *Blood*, 1953, 8, 554.
15. DAVIES M. et ENGLERT M. — *J.B.C.*, 1960, 235, 1011.
16. DERECHIN M. — *Biochem. J.*, 1961, 78, 443-448.
17. FLETCHER A. P. et JOHNSON A. J. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1957, 94, 233.
18. FRANKLIN E. C. — *J. Clin. Invest.*, 1959, 38, 2159-2167.
19. GARNER R. L. et TILLET W. S. — *J. Exptl. Med.*, 1934, 60, 239.
20. GERHEIM E. B., FERGUSON J. H., TRAVIS B. L., JOHNSTON C. L. et BOYLES P. W. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1948, 62, 246.
21. HAGAN J. J., ABLONDI F. B. et RENZO E. C. — *J.B.C.*, 1960, 235, 1005-1010.
22. JACOBSSON K. — *Scand. J. Clin. Lab. et Invest.*, 1955, 7, suppl. 14.
23. KAPLAN M. H. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1944, 57, 40.
24. KAPLAN M. H. — *J. Clin. Invest.*, 1946, 25, 331.
25. KAULLA K. vor. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1954, 44, 944.
26. KJELGAARD N. O. et PLOUG J. — *B.B.A.*, 1957, 24, 283.
27. KLINE D. L. — *J.B.C.*, 1953, 204, 949.
28. KLINE D. L. et FISHMAN J. B. — *J.B.C.*, 1961, 236, 2807-2812.
29. LACK C. H. — *Nature*, 1948, 161, 559.
30. LASSEN M. — *B.J.*, 1958, 69, 360-366.
31. LEPOW J. H., PELLEMER L. et RATNOFF O. D. — *J. Exptl. Med.*, 1953, 98, 32.
32. LEWIS J. H. et FERGUSON J. H. — *Am. J. Physiol.*, 1951, 166, 594.
33. MAC FARLANE R. G. et BIGGS R. — *Blood*, 1948, 3, 1167.
34. MAC FARLANE R. G. et PILLING J. — *Nature*, 1947, 159, 779.
35. MILESTONE J. H. — *J. Immunol.*, 1941, 42, 109.
36. MOUNTER L. A. et SHIPLEY B. A. — *J.B.C.*, 1958, 231, 855.
37. MULLERTZ S. — *B.J.*, 1955, 61, 424.
38. MULLERTZ S. et LASSEN M. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1953, 82, 264.
39. NEURATH H. et SCHWERT G. W. — *Chem. Revs.*, 1950, 461, 69.
40. NIEWIAROWSKI S. et LATELLO Z. — *Thromb. Diathesis Haem.*, 1959, 3, 404.

41. NORMAN P. S. — *J. Exptl. Med.*, 1957, **106**, 423.
 42. NORMAN P. S. et HILL B. M. — *J. Exptl. Med.*, 1958, **108**, 639.
 43. PAUL J. et FOTTRELL P. — *Biochem. J.*, 1961, **78**, 418-424.
 44. PILLEMER L., RATNOFF O. D., BLUM L. et LEPOW J. H. — *J. Exptl. Med.*, 1952, **97**, 573.
 45. PLOUG J. et KJELGAARD N. O. — *B.B.A.*, 1957, **24**, 278.
 46. RATNOFF O. D. — *J. Exptl. Med.*, 1948, **87**, 199.
 47. REMMERT L. F. et COHEN P. P. — *J.B.C.*, 1949, **181**, 431.
 48. ROBERTS P. R. — *J.B.C.*, 1960, **235**, 2263-2266.
 49. RONWIN D. — *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 1956, **34**, 1169.
 50. SHERRY S., FLETCHER A. P. et ALKJAERSIG N. — *Physiol. Revs.*, 1959, **39**, 343.
 51. SHULMAN S., ALKJAERSIG N. et SHERRY S. — *J.B.C.*, 1958, **233**, 91.
 52. SOBOL G. W., MOHLER S. R., JONES N. W., DOWDY A. B. C. et GUEST M. M. — *Am. J. Physiol.*, 1952, **171**, 768.
 53. TILLET W. S. — *Bact. Rev.*, 1938, **2**, 161.
 54. TILLET W. S., EDWARDS L. B. et GARNER R. L. — *J. Clin. Invest.*, 1934, **13**, 47.
 55. TILLET W. S. et GARNER R. L. — *J. Exptl. Med.*, 1935, **58**, 485.
 56. TILLET W. S., JOHNSON A. J. et MAC CARTHY W. R. — *J. Clin. Invest.*, 1955, **34**, 169.
 57. TROLL W., SHERRY S. et WACHMAN J. — *J.B.C.*, 1954, **208**, 85.
 58. URIEL J. — *Nature*, 1960, **188**, 853-854.
 59. URIEL J. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **101**, 104-119.
 60. URIEL J. et AVRAMEAS S. — à paraître.
 61. VAUX St CYR Ch. de, CLEVE H., GOODMAN H. et GRABAR P. — Protides of the Biological Fluids Proceedings of the 8th Colloquium, Bruges, 1960, p. 65-68.
 62. VAUX St CYR Ch. de, CLEVE H. et G. HERMANN. — à paraître.
 63. VAUX St CYR Ch. de, HERMANN G. et N. TALAL. — à paraître.
 64. WEBB T., ROSE B. et SEHON A. H. — *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1958, **36**, 1168-1175.
 65. WILLIAMS J.R.B. — *J. Exptl. Path.*, 1951, **32**, 530.
-

DEUXIÈME THÈSE.

Propositions données par la Faculté :

Etude des protéines urinaires
après chromatographie
sur diethylaminoéthylcellulose

Vu et approuvé :

Paris, le 9 Mai 1962.

Le doyen de la Faculté des Sciences,

MARC ZAMANSKY.

VU

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

JEAN ROCHE.



Achevé d'imprimer le 1^{er} Octobre 1962.

IMPRIMERIE M. DECLUME, LONS-LE-SAUNIER — 581-62-250.
Octobre 1962 « Dépôt légal 4^e trimestre 1962 — N° 5339 ».

